



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



**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE
ANTI-HIPERTENSIVA DE HIDROLISADOS COMERCIAIS
DE DIVERSAS FONTES PROTÉICAS**

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

MARIZA FARIA
Nutricionista

FLÁVIA MARIA NETTO
Orientadora

Campinas, Outubro de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F225a Faria, Mariza
Avaliação in vitro e in vivo da atividade anti-hipertensiva de
hidrolisados comerciais de diversas fontes protéicas / Mariza Faria. --
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Flávia Maria Netto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Hidrolisados protéicos. 2. Enzima conversora de angiotensina.
3. Atividade anti-hipertensiva. 4. Ratos espontaneamente
hipertensos. 5. Digestão enzimática. I. Netto, Flávia Maria. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: In vitro and in vivo assessment of the antihypertensive activity of
commercial hydrolysates from various protein sources

Palavras-chave em inglês (Keywords): Protein hydrolysates, Angiotensin-converting
enzyme, Antihypertensive activity, Spontaneously
hypertensive rat, Enzymatic digestion

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada a Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flávia Maria Netto

Úrsula Maria Lanfer Márquez

Célio Kenji Miyasaka

José Antonio Rocha Gontijo

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Maria Netto
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(orientador)

Profa. Dra. Úrsula Maria Lanfer Márquez
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
(membro)

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo
Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP
(membro)

DEDICATÓRIA

Ao meu amor Bruno, por me incentivar, pelo apoio e paciência incondicional, estando sempre presente nos momentos delicados e por tudo que representa na minha vida.

Aos meus queridos pais, Cidinha e Edézio, pela educação que recebi, por toda dedicação, carinho e amor.

A grande companheira Elizabete, pelos ensinamentos transmitidos com paciência, consideração e atenção, pela preciosa amizade e momentos de descontração.

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Maria Netto, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela disciplina, disponibilidade, auxílio e atenção.

Ao Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo pelas valiosas sugestões e por disponibilizar seu laboratório para a realização dos experimentos biológicos.

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán pela gentileza em ceder o aparelho de eletroforese capilar para as análises *in vitro* e de caracterização.

Aos professores presentes na banca: Profa. Dra. Úrsula Maria Lanfer Márquez, Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka e Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo, pelas sugestões propostas para a composição final deste trabalho.

Às queridas amigas do laboratório de Bioquímica Nutricional: Betinha, Sônia, Lucia, Adriana, Liz, Andréa e Janai, pelos inesquecíveis momentos compartilhados juntos – pelas noites, madrugadas e finais de semana de trabalho, companheirismo e descontração.

À Eliana, nossa querida “Li”, por sua ajuda irrestrita, competência e respeito ao nosso trabalho. Sem você, não sei o que seria de nós.

À funcionária Beth, pela acolhida e colaboração.

A todos do laboratório de Balanço Hidro-Salino pela agradável convivência e troca de experiências. Em especial, agradeço às técnicas Amanda e Beth pela dedicação e ajuda na parte experimental.

Ao Prof. Nilo Sérgio Sabbião Rodrigues pela orientação no PED. Obrigada pela atenção e compreensão.

Aos meus colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição: Dona Nice, Suzana, Soeli, Laura, Márcio, Cibelem, Fabiane, Elisvânia, Maria Inês, Laércio e Éder, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Às minhas companheiras de casa: Cláudia, Cris, Eliza, Kátia e Juliana, pela agradável convivência, amizade, incentivo, pelas boas risadas e pelos momentos de desabafo (Bllaaaá).

Agradeço a todos da minha família, em especial meus irmãos Nilson, Edílson e Ana Lúcia pelos conselhos, afeto, incentivo e apoio.

A Gelita South América pelo suporte financeiro e doação dos colágenos hidrolisados.

A DMV International e Kerry Bio-Science pela doação dos hidrolisados comerciais.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xxiii
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxix
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Objetivos	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	4
1. Hipertensão arterial sistêmica	4
1.1 Epidemiologia	4
1.2 Mecanismos de controle da pressão arterial	5
2. Peptídeos biologicamente ativos	8
2.1 Peptídeos inibidores da ECA	9
3. Avaliação da atividade anti-hipertensiva <i>in vitro</i>	14
4. Avaliação da atividade anti-hipertensiva <i>in vivo</i>	15
5. Biodisponibilidade de peptídeos inibidores da ECA	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
 CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTI- HIPERTENSIVA DE HIDROLISADOS COMERCIAIS DE DIVERSAS FONTES PROTÉICAS: INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS GASTRINTESTINAIS	 31
RESUMO	31
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS	37

2.1 Material	37
2.2 Métodos	38
2.2.1 Planejamento geral do experimento	38
2.2.2 Caracterização dos hidrolisados	39
2.2.2.1 Eletroforese capilar	39
2.2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
2.2.2.3 Grau de Hidrólise.....	40
2.2.2.4 Osmolalidade.....	41
2.2.3 Medida da atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i>	41
2.2.4 Atividade anti-hipertensiva <i>in vivo</i>	42
2.2.4.1 Protocolo experimental	42
2.2.4.2 Medida da pressão arterial	43
2.2.4.3 Experimento crônico	44
2.2.5 Estabilidade dos peptídeos com atividade inibitória da ECA à hidrólise com enzimas gastrintestinais	45
2.2.6 Análise estatística	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 Caracterização dos hidrolisados	47
3.2 Medida da atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i>	59
3.3 Atividade anti-hipertensiva <i>in vivo</i>	63
3.3.1 Experimento Crônico	74
4. CONCLUSÕES	77
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS COMERCIAIS NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS	85
RESUMO	85
ABSTRACT	86
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Estudo da função renal	89
2.2 Análise estatística	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4. CONCLUSÕES.....	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
CONCLUSÕES GERAIS.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

Figura 1: Mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina.....	6
Figura 2: Modelo proposto de ligação entre substratos ou inibidores competitivos e o local ativo da ECA.....	7

CAPÍTULO I

Figura 1: Fluxograma dos experimentos realizados no presente estudo.....	38
Figura 2: Seqüência de tratamentos para determinar a resistência dos hidrolisados às enzimas gástricas.....	39
Figura 3: Fluxograma dos experimentos de determinação da pressão arterial dos ratos	43
Figura 4: Medida da pressão arterial. (a) Caixa para aquecer os ratos. (b) Aparelho para medir a pressão arterial em ratos	44
Figura 5: Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de colágeno bovino (a) e suíno (b). Coluna 1 – CHB; coluna 2 – Fração BP1; coluna 3 – Fração BP2; coluna 4 – Fração BP3; coluna 5 – Padrões; coluna 6 - CHS; coluna 7 - Fração SP1; coluna 8 – Fração SP2; coluna 9 – Fração SP3.....	49
Figura 6: Eletroforegramas do hidrolisado Hyprol 8052: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	52
Figura 7: Eletroforegramas do hidrolisado Hyprol 3301: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	52
Figura 8: Eletroforegramas do hidrolisado Hyprol 4137: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	53
Figura 9: Eletroforegramas do hidrolisado CE90ACE: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	53
Figura 10: Eletroforegramas do hidrolisado WE80BG: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	54
Figura 11: Eletroforegramas do hidrolisado SE50BT: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	54
Figura 12: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	55
Figura 13: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino fração P1, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	56

Figura 14: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino fração P2, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	56
Figura 15: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino fração P3, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	57
Figura 16: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	57
Figura 17: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno fração P1, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	58
Figura 18: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno fração P2, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	58
Figura 19: Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno fração P3, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	59
Figura 20: Eletroferograma da reação entre a ECA e HHL sem inibição (a); e com inibição parcial induzida pela adição de 0,08 mg/ml do hidrolisado WE80BG (b).....	59
Figura 21: Determinação do valor IC ₅₀ pela análise de regressão do logaritmo da área do ácido hipúrico em função da concentração do hidrolisado WE80BG. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.....	60
Figura 22: Valor de IC ₅₀ (mg proteína/mL) obtido para os hidrolisados comerciais antes e após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina. Hidrolisados comerciais: Hyprol 8052 – caseína, Hyprol 3301 – soro de leite, Hyprol 4137 – glúten de trigo, CE90ACE – caseína, WE80BG – soro de leite e SE50BT – soja. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.....	61
Figura 23: Valor de IC ₅₀ (mg proteína/mL) obtido para os hidrolisados de colágeno de origem bovina e suína antes e após a hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina. Colágenos hidrolisados: CHB – bovino não fracionado; CHBP1 – bovino fração P1; CHBP2 – bovino fração P2; CHBP3 – bovino fração P3; CHS – suíno não fracionado; CHSP1 – suíno fração P1; CHSP2 – suíno fração P2; CHSP3 – suíno fração P3. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.....	62
Figura 24: Comportamento da pressão arterial média de SHR após a administração oral de três diferentes doses do hidrolisado Hyprol 8052 (a), Hyprol 3301 (b), Hyprol 4137 (c), CE90ACE (d), WE80BG (e) e SE50BT (f), em comparação com os grupos controles que receberam água e lisinopril (*p<0,05 vs PA basal, teste t) (** p<0,01 vs PA basal, teste t). Resultados apresentados como média de 6 animais ± erro padrão.....	64
Figura 25: Curva dose-resposta da redução da PA em ratos espontaneamente hipertensos para os hidrolisados CHB e CHSP1, após 3 horas da administração oral (*p<0,05 vs PA basal, teste t). Resultados apresentados como média de 6 animais ± erro padrão.....	68

Figura 26. Efeito da administração oral (500 mg/kg de peso corporal) dos hidrolisados de colágeno bovino (a) e suíno (b) e de suas frações na pressão arterial de SHR, em comparação com os grupos controles que receberam água e lisinopril_(*p<0,05 vs PA basal, teste t) (** p<0,01 vs PA basal, teste t). Colágenos hidrolisados: CHB – bovino não fracionado; CHBP1 – bovino fração P1; CHBP2 – bovino fração P2; CHBP3 – bovino fração P3; CHS – suíno não fracionado; CHSP1 – suíno fração P1; CHSP2 – suíno fração P2; CHSP3 – suíno fração P3. Resultados apresentados como média de 6 animais ± erro padrão..... 69

Figura 27: Comparação entre os resultados *in vitro* x *in vivo*. (1) Valores de IC₅₀ (mg proteína/mL) obtidos para os hidrolisados comerciais antes (a) e depois (b) da hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. (2) Mudanças na pressão arterial de SHR após 5 horas da administração oral dos hidrolisados (*p<0,05 vs PA basal, teste t) (** p<0,01 vs PA basal, teste t). Letras iguais indicam mesmo nível de significância e letras diferentes indicam diferença estatística p<0,05 (teste Tukey) Ver materiais e métodos para codificação das amostras..... 71

Figura 28: Comparação entre os resultados *in vitro* x *in vivo*. (1) Valores de IC₅₀ (mg proteína/mL) obtidos para os colágenos hidrolisados bovino e suíno antes (a) e depois (b) da hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. (2) Mudanças na pressão arterial de SHR após 5 horas da administração oral dos hidrolisados (*p<0,05 vs PA basal, teste t) (** p<0,01 vs PA basal, teste t). Letras iguais indicam mesmo nível de significância e letras diferentes indicam diferença estatística p<0,05 (teste Tukey) Ver materiais e métodos para codificação das amostras..... 72

Figura 29: Comportamento da pressão arterial média de ratos SHR após a administração oral crônica do hidrolisado WE80BG (a) e CHBP1 (b), em comparação com o grupo controle que recebeu água. (*p<0,05 vs PA basal, teste t) (** p<0,001 vs PA basal, teste t) (# p<0,05 vs grupo controle, teste t).. Resultados apresentados como média de 5 animais ± erro padrão..... 75

CAPÍTULO II

Figura 1: Gaiola metabólica..... 90

Figura 2: Taxa de filtração glomerular estimada pelo *clearance* de creatinina após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (*p<0,05 versus Água, **p<0,05 versus Lisinopril, test Bonferroni)..... 94

Figura 3: Fração de excreção de sódio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal)..... 95

Figura 4: Fração de excreção proximal de sódio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (*p<0,05 versus Água, test Bonferroni)..... 96

Figura 5: Fração de excreção pós-proximal de sódio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (*p<0,05 versus Água, test Bonferroni)..... 96

Figura 6: Fração de excreção de potássio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (*p< 0,05 versus Água, test Bonferroni)..... 98

ÍNDICE DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

Tabela 1: Classificação da pressão arterial	5
Tabela 2: Efeito hipotensor de hidrolisados protéicos do leite e produtos fermentados	17

CAPÍTULO I

Tabela 1: Proteína bruta, grau de hidrólise e osmolalidade dos hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas.....	47
Tabela 2: Proteína bruta, grau de hidrólise e osmolalidade dos hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas após hidrólise <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	47
Tabela 3: Proteína bruta, grau de hidrólise e osmolalidade dos colágenos hidrolisados e suas frações, antes e após hidrólise gastrointestinal <i>in vitro</i> com as enzimas pepsina e pancreatina.....	49

RESUMO

Peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) presentes em alimentos têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois há evidências que sua ingestão, possa auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão. O potencial da atividade anti-hipertensiva de peptídeos tem sido avaliado principalmente com relação à capacidade de inibir a ECA, que tem papel fundamental na regulação da pressão arterial. Desta forma, inúmeros estudos têm focado a produção e o isolamento de peptídeos com atividade inibidora da ECA a partir de proteínas de diferentes fontes alimentícias, embora ainda pouco se conhece sobre a biodisponibilidade destes peptídeos. O presente estudo teve como objetivos: avaliação da influência das enzimas do trato gastrointestinal na atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos e sua correlação com a atividade anti-hipertensiva avaliada *in vivo* e avaliar o efeito anti-hipertensivo e na função renal de hidrolisados de diferentes fontes. Utilizou-se hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas: caseína (Hyprol 8052), soro de leite (Hyprol 3301) e glúten de trigo (Hyprol 4137) fornecidos pela Kerry Bio-Science; caseína (CE90ACE), soro de leite (WE80BG) e soja (SE50BT), doados pela DMV International e colágenos hidrolisados de origem bovina e suína (Gelita South América). Os colágenos hidrolisados foram fracionados em sistema de ultrafiltração com membranas de *cut off* de 30 a 50 kDa, 5 a 8 kDa e 1 a 2 kDa, obtendo-se os permeados P1 (PM< 30-50kDa), P2 (PM< 5-8kDa) e P3 (PM< 1-2 kDa), respectivamente. Os hidrolisados foram caracterizados físico-quimicamente e em seguida analisados quanto à capacidade de inibição da ECA antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*, e atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) por via oral. Os produtos que apresentaram as melhores atividades *in vivo* foram avaliados quanto à sua influência na função renal dos animais e efeito hipotensor prolongado na pressão arterial de SHR, em experimento crônico. A hidrólise gastrointestinal *in vitro* promoveu efeito variável sobre a atividade inibitória da ECA. Os hidrolisados de maior peso molecular, colágenos hidrolisados bovino e suíno, apresentaram aumento significativo da potência inibitória da ECA. Por outro lado, observou-se redução na capacidade de inibir a ECA dos hidrolisados com menor peso molecular, como os hidrolisados da caseína (Hyprol 8052 e CE90ACE), soro de leite (Hyprol 3301) e soja (SE50BT). Os colágenos hidrolisados bovino e suíno e suas frações, tanto antes como após a digestão gastrointestinal *in vitro* apresentaram menor potência inibitória da ECA que os demais hidrolisados. Todos os hidrolisados anali-

sados foram capazes de induzir redução significativa da pressão arterial de SHR, exceto os colágenos hidrolisados bovino (CHB) e suíno (CHS) não fracionados. Os hidrolisados do soro de leite (WE80BG), caseína (CE90ACE), fração P1 do colágeno bovino e suíno (CHBP1 e CHSP1) e a fração P3 do colágeno hidrolisado suíno (CHSP3) foram os mais eficientes em reduzir a pressão arterial de SHR. A administração oral crônica dos hidrolisados WE80BG e CHBP1 induziu uma redução progressiva e significativa da pressão arterial de SHR, sendo a diferença de 20,60 mmHg e 10 mmHg, respectivamente, em relação à pressão basal. O hidrolisado CE90ACE, que apresentou uma das melhores atividades anti-hipertensivas *in vivo*, induziu redução na filtração glomerular dos animais e promoveu maior excreção de sódio na porção pós-proximal do ducto renal, provavelmente devido a um efeito vasodilatador, decorrente da inibição da ECA.

Ao comparar os resultados obtidos *in vivo* com os valores de IC₅₀ antes e após a hidrólise gastrointestinal, não se observou relação entre a eficiência em inibir a ECA *in vitro* e a redução da pressão arterial *in vivo* dos hidrolisados protéicos comerciais. Em conclusão, as enzimas gastrointestinais exercem grande influência sobre atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados protéicos comerciais, podendo aumentar ou diminuir o efeito hipotensor *in vivo*. Porém, a digestão gastrointestinal *in vitro* dos hidrolisados antes da avaliação do potencial inibidor da ECA unicamente não se mostrou vantajosa para a predição da atividade biológica dos hidrolisados, pois além da digestão gastrointestinal há outros fatores e/ou mecanismos que podem estar envolvidos com o decréscimo da pressão arterial produzido pela ação dos peptídeos.

Palavras-chave: hidrolisados protéicos; enzima conversora de angiotensina; atividade anti-hipertensiva; ratos espontaneamente hipertensos; digestão enzimática.

ABSTRACT

Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides present in foods have motivated the interest of many researchers, since there is evidence that the ingestion of these peptides, could aid in the prevention and in the non-medication treatment of hypertension. The anti-hypertensive activity of the peptides has been mainly assessed in relation to their capacity to inhibit the ACE, which has a fundamental role in regulating the blood pressure. In this way, innumerable studies have focused on the production and isolation of peptides with ACE-inhibitory activity from proteins from different food sources, though still little is known about the bioavailability of this peptides. The objectives of the present study were: assess the influence of the gastrointestinal enzymes on the ACE-inhibitory activity of protein hydrolysates and the correlation with the anti-hypertensive activity assessed *in vivo*, and to assess the anti-hypertensive effect and kidney function of hydrolysates from different sources. Commercial hydrolysates from the following protein sources were used: casein (Hyprol 8052), milk whey (Hyprol 3301) and wheat gluten (Hyprol 4137), all provided by Kerry Bio-Science; casein (CE90ACE), milk whey (WE80BG) and soy (SE50BT), donated by DMV International, and hydrolysed collagens of bovine and porcine origins (Gelita South America). The hydrolysed collagens were fractionated in an ultrafiltration system using membranes with cut-offs of 30 to 50 kDa, 5 to 8 kDa and 1 to 2 kDa, obtaining the permeates P1 (PM<30-50 kDa), P2 (PM<5-8 kDa) and P3 (PM<1-2 kDa), respectively. The hydrolysates were physicochemically characterised and analysed for their ACE-inhibitory capacity before and after *in vitro* gastrointestinal digestion, and for their anti-hypertensive activity in spontaneously hypertensive rats (SHR) via oral. The products presenting the best activity *in vivo*, were assessed for their influence on the kidney function of the animals and for their prolonged hypotensive effect on the blood pressure of SHR in a chronic experiment. The *in vitro* gastrointestinal hydrolysis promoted a variable effect on the ACE-inhibitory activity. The higher molecular weight hydrolysates, bovine and porcine collagen hydrolysates, presented a significant increase in the ACE-inhibitory potential. On the other hand a reduction in the ACE-inhibitory potential was observed for the smaller molecular weight hydrolysates, such as the casein (Hyprol 8052 and CE90ACE), milk whey (Hyprol 3301) and soy (SE50BT) hydrolysates. The bovine and porcine collagen hydrolysates and their fractions, both before and after *in vitro* gastrointestinal digestion, presented lower ACE-inhibitory potential than the other hydrolysates. All the hydrolysates analysed were capable of inducing a significant reduction

in blood pressure in the SHR, except for the non-fractionated bovine (BCH) and porcine (PCH) collagen hydrolysates. The milk whey (WE80BG) and casein (CE90ACE) hydrolysates, P1 fractions of bovine and porcine collagen (BCHP1 and PCHP1) and the P3 fraction of the porcine collagen hydrolysate (PCHP3) were the most efficient in reducing the blood pressure in SHR. The chronic oral administration of the hydrolysates WE80BG and BCHP1 induced a progressive, significant reduction in the blood pressure of the SHR, showing a difference of 20.60 mmHg and 10 mmHg, respectively, as compared to the basal pressure. The hydrolysate CE90ACE, which presented one of the best *in vivo* anti-hypertensive activities, induced a reduction in glomerular filtration by the animals and promoted greater sodium excretion at the post-proximal portion of the kidney duct, probably due to a vasodilatory effect on account of ACE-inhibition.

On comparing the *in vivo* results with the IC_{50} values, before and after gastrointestinal hydrolysis, no relation was observed between the *in vitro* ACE-inhibitory efficiency and the *in vivo* reduction in blood pressure by the commercial protein hydrolysates. In conclusion, the gastrointestinal enzymes exert considerable influence on the anti-hypertensive activity of the commercial protein hydrolysates, and can increase or decrease the *in vivo* hypotensive effect. Thus the *in vitro* gastrointestinal digestion of the hydrolysates alone, before the assessment of the ACE-inhibitory potential, is apparently of no advantage in predicting the biological activity of the hydrolysates, since apart from the gastrointestinal digestion other factors and/or mechanisms can also be involved in the decrease in blood pressure produced by the action of the peptides.

Keywords: protein hydrolysates; angiotensin-converting enzyme; antihypertensive activity; spontaneously hypertensive rat; enzymatic digestion.

INTRODUÇÃO GERAL

Além de suprir aminoácidos e energia, que são essenciais para o crescimento e manutenção do organismo, os alimentos protéicos representam importante fonte de peptídeos biologicamente ativos, que podem desempenhar funções diversas, como moduladores de vários processos corporais (Meisel, 1997; Li et al., 2004).

Os peptídeos biologicamente ativos podem ser obtidos pela hidrólise enzimática *in vitro* ou *in vivo* de diversas fontes protéicas. Dentre as propriedades fisiológico-funcionais que esses peptídeos podem desempenhar destacam-se: atividade anti-hipertensiva, ação estimulante do sistema imunológico, atividade opióide, aumento da biodisponibilidade de minerais, atividade anti-úlceras, antioxidante, anti-carcinogênica, anti-microbiana e atividade hipocolesterolêmica (Walzem, Dillard e German, 2002; Costa, 2004)

Dentre os peptídeos bioativos, especial atenção tem sido dada aos que inibem a enzima conversora da angiotensina (ECA) (EC.3.4.15.1). Esta enzima é responsável pela hidrólise de dois importantes substratos envolvidos na regulação da pressão arterial, a angiotensina I e a bradicinina. Muitos peptídeos que desempenham essa função foram identificados nos hidrolisados enzimáticos de proteínas do leite (Maeno, Yamamoto e Takano, 1996; Nurminen et al., 2000; Sipola et al., 2002b) soja, (Kinoshita, Yamakoshi e Kikuchi, 1993; Wu e Ding, 2002), nas proteínas do plasma bovino (Hyun e Shin, 2000) e também em hidrolisados de peixes (Fujita et al., 1995; Byun e Kim, 2001) .

O emprego de peptídeos inibidores da ECA tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois há evidências que a ingestão desses peptídeos, presentes em alimentos formulados, possa auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão (Li et al., 2004).

Apesar do potencial efeito anti-hipertensivo de muitos peptídeos inibidores da ECA derivados de proteínas alimentares, é importante enfatizar que a atividade inibitória dos peptídeos é determinada, em geral, *in vitro*. No entanto, trabalhos relatam que nem sempre hidrolisados que apresentam alta atividade *in vitro* apresentam a mesma atividade *in vivo* e vice-versa (Fujita et al., 1995; Maeno, Yamamoto e Takano, 1996; Abubakar et al., 1998; Saito et al., 2000). A falta de concordância dos resultados é, em geral, explicada

como sendo o efeito das enzimas digestivas e séricas nos hidrolisados, que levaria à produção de peptídeos com atividade diferente daquela demonstrada pela medida *in vitro*. Outra explicação seria que, além da inibição da ECA, outros mecanismos como sistema nervoso autônomo ou sistema do óxido nítrico, poderiam estar envolvidos com o decréscimo da pressão arterial produzido pela ação dos peptídeos bioativos (Li et al., 2004; Vermeirssen, Camp e Verstraete, 2004)

No estudo realizado por Costa (2004), não houve uma boa correlação entre a inibição da ACE *in vitro* e a redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A hidrólise do concentrado do soro de leite pela ação da α -quimiotripsina (EC.3.4.21.1) e alcalase resultou em dois produtos com IC₅₀ em torno de 0,05 mg/mL e 0,7 mg/mL, respectivamente. No entanto, apenas o hidrolisado produzido pela alcalase reduziu significativamente a pressão arterial de SHR após a administração oral.

Murakami et al. (2004) pesquisaram a atividade anti-hipertensiva em 12 tipos de hidrolisados protéicos comerciais de diferentes fontes protéicas. Esses autores verificaram que dois hidrolisados um do soro de leite (WE80M) e outro derivado da ovoalbumina (EE90FX), foram os que apresentaram os maiores índices de inibição da ECA (78,2 %), porém, somente o hidrolisado do soro de leite foi capaz de promover um decréscimo significativo na pressão arterial de SHR. Por outro lado, os hidrolisados da caseína (CE90GMM) e do soro de leite (WE80BG) induziram um forte efeito hipotensor nos animais, embora apenas com médios índices de inibição da ECA (~50%).

Diante do exposto, a resistência dos peptídeos inibidores da ECA à digestão gastrointestinal deve ser estudada, pois ainda não se sabe se esses peptídeos são estáveis aos processos digestivos do organismo. Assim, ensaios de digestibilidade *in vitro* têm sido desenvolvidos com esse objetivo. De maneira geral, os ensaios *in vitro* baseiam-se na incubação dos peptídeos com as enzimas pepsina (EC.3.4.23.1), tripsina (EC.3.4.21.4), quimotripsina, pancreatina (EC.232.468.9) etc.. em condições ótimas de hidrólise fisiológica (Maeno, Yamamoto, Takano, 1996; Matsui et al., 2002; Vermeirssen et al., 2003).

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a propriedade anti-hipertensiva de hidrolisados protéicos de diferentes fontes e sua biodisponibilidade por métodos *in vitro* e *in vivo*.

1.2. Específicos

- Avaliar o efeito dos hidrolisados na inibição da ECA e redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos.
- Avaliar a resistência dos peptídeos inibidores da ECA às enzimas digestivas.
- Avaliar a possível correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo* e estudar a interferência das enzimas gastrintestinais nestes resultados.
- Avaliar a influência dos hidrolisados com propriedade anti-hipertensiva na função renal de ratos espontaneamente hipertensos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

1. Hipertensão arterial sistêmica

1.1 Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica é, atualmente, considerada uma das mais sérias doenças crônicas, por estar relacionada ao aumento significativo do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Kim et al., 2001). Estima-se que 22% a 68% da população adulta mundial apresentem hipertensão arterial (HA). No Brasil, na última década, foram realizados diversos inquéritos populacionais em amostras representativas, que indicam variações na prevalência de HA entre 22% e 44% (Fuchs, Castro e Fuchs, 2004).

Além de apresentar alto custo social, respondendo por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e de absenteísmo no trabalho, a HA é uma das mais importantes causas de morbi-mortalidade universal, sendo responsável pela redução da expectativa e qualidade de vida (JNC 6, 1997).

Trata-se de uma afecção comum, assintomática, prontamente detectável, em geral de fácil tratamento e que costuma gerar complicações letais quando não tratada. É caracterizada por uma elevação da pressão arterial para números acima dos valores considerados normais (140/90 mmHg) (Willians, 1998). Níveis pressóricos cada vez menores têm sido valorizados pelo seu potencial preventivo (Tabela 1). A meta, com o tratamento da HA, é atingir uma pressão arterial < 140/90 mmHg. Metas menores (< 130/80 mmHg) são recomendadas para os diabéticos e em presença de doença renal (JNC 7, 2003; Pozzan et al., 2003;).

Apesar dos esforços para diagnosticar e tratar a hipertensão, cerca de 35% a 83% dos portadores de hipertensão desconhecem ser sua condição e aproximadamente 75% a 92% daqueles em tratamento não mantêm a hipertensão controlada (Fuchs, Castro e Fuchs, 2004).

Tabela 1. Classificação da pressão arterial

Diretrizes Brasileiras (2002)			JNC 7 (2003)		
Classificação	PAS (mmHg) ¹	PAD (mmHg) ²	Classificação	PAS (mmHg) ¹	PAD (mmHg) ²
Ótima	< 120	< 80	Normal	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85	Pré-	120 - 139	80-89
Normal limítrofe	130 -139	85-89	HA Estágio 1	140 -149	90-99
HA Estágio 1	140 -159	90-99	HA Estágio 2	≥ 160	≥ 100
HA Estágio 2	160 -179	100-109			
HA Estágio 3	≥ 180	≥ 110			

¹ Pressão arterial sistólica

² Pressão arterial diastólica

Fonte: Pozzan et al., 2003

Estudos têm demonstrado que a redução da pressão arterial determina diminuição significativa do risco de eventos vasculares. Reduções de 10 mmHg da pressão sistólica e 5 mmHg da pressão diastólica estão associados a uma diminuição do risco de morte de 40% para acidente vascular cerebral (AVC) e 30% para doença arterial coronária isquêmica e outras afecções vasculares. Conclui-se, portanto, que a implementação de medidas anti-hipertensivas adequadas pode acarretar um decréscimo absoluto e importante de mortes prematuras e de eventos altamente incapacitantes, como são os quadros de AVC (Dórea e Lotufo, 2004; Lewington, Clarke, Qizilbash, 2002; Vasan et al., 2001).

1.2 Mecanismos de controle da pressão arterial

A pressão arterial (PA) é regulada por vários mecanismos inter-relacionados. Entre eles, são encontrados o sistema nervoso, especificamente com a função adrenérgica e catecolaminas, o sistema renina-angiotensina com a função excretora dos rins, incluindo o transporte do sódio e água e outras funções mediadas por outros mecanismos hormonais e de equilíbrio hidroeletrolítico (Guyton e Hall, 2001).

O sistema renina-angiotensina é considerado um dos mais importantes sistemas reguladores da PA. A renina é uma enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa nas células justaglomerulares dos rins. Quando a PA diminui, ocorre a liberação da renina para a corrente sanguínea, resultando na ruptura de seu substrato natural, o angiotensinogênio, e a liberação da angiotensina I. Após a formação desse peptídeo, dois de seus aminoácidos são removidos para formar a angiotensina II. Essa reação é

catalisada pela enzima conversora da angiotensina (ECA), presente no endotélio dos vasos pulmonares (Guyton e Hall, 2001). Os principais efeitos da angiotensina II consistem em estimular a síntese e a secreção de aldosterona pelo córtex suprarrenal e em elevar a pressão arterial através da constrição direta do músculo liso das arteríolas. Todavia, o hormônio ainda exerce outras ações, incluindo estimulação do coração e do sistema nervoso simpático, que complementam o efeito vascular direto e contribuem para a elevação da pressão arterial causada pela angiotensina (Gilman et al., 1991). O mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina está esquematizado na Figura 1.

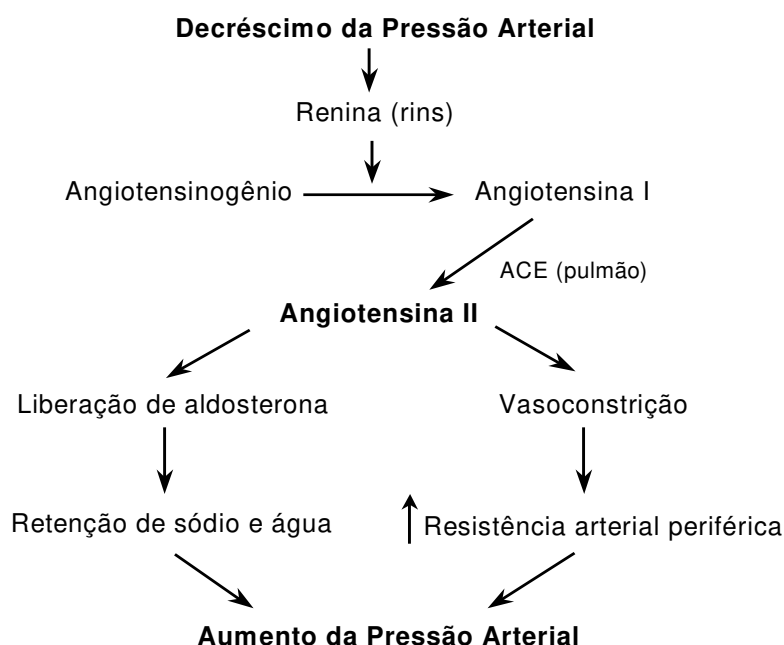


Figura 1. Mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina (Guyton e Hall, 2001).

A ECA é uma enzima multifuncional que exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea pela transformação da forma inativa do decapeptídeo angiotensina I, em um potente vasoconstritor, octapeptídeo angiotensina II, e pela inativação catalítica da bradicinina, a qual tem ação depressora (Byun e Kim, 2001).

Embora ocorra conversão lenta da angiotensina I em angiotensina II no plasma, o metabolismo muito rápido observado *in vivo* é decorrente, em grande parte, da atividade da ECA ligada aos tecidos, presente no lado luminal das células endoteliais vasculares

em órgãos tais como o cérebro, coração, pulmão, fígado, intestino, pâncreas, baço, glândulas adrenais e placenta (Gilman et al., 1991; Fitzgerald, Murray e Walsh, 2004).

A ECA humana (dipeptidilcarboxipeptidase) é uma zinco-protease constituída de 1278 resíduos de aminoácidos. É uma enzima bastante inespecífica, que cliva unidades dipeptídicas de substratos com diversas seqüências de aminoácidos. A Figura 2 está representando o modelo proposto de ligação entre substratos ou inibidores competitivos e os sítios ativos da ECA. A enzima parece ter dois domínios homólogos, cada um com um sítio catalítico, uma região de ligação do Zn^{2+} e um grupo doador de hidrogênio (X-H). As regiões S_1 , S'_1 e S'_2 representam os sítios que podem interagir com os resíduos de aminoácidos dos substratos ou inibidores peptídicos (Gilman et al., 1991; Li et al., 2004).

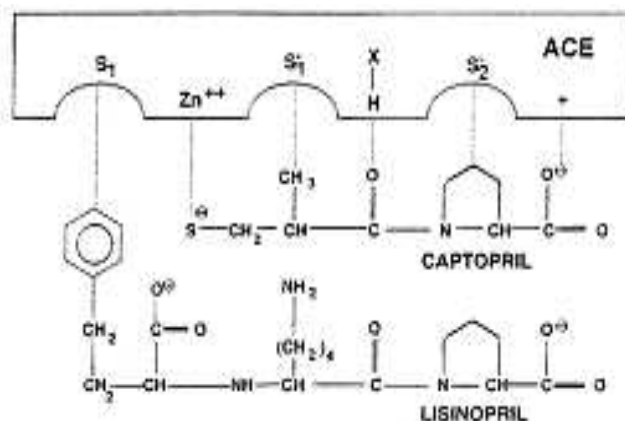


Figura 2. Modelo proposto de ligação entre substratos ou inibidores competitivos e o local ativo da ECA (Li et al., 2004).

Como a ECA está envolvida na regulação da pressão arterial e atua indiretamente no metabolismo hidroeletrolítico, muitas drogas sintéticas têm sido desenvolvidas com intuito de inibir sua atividade e promover sucessivamente a redução da pressão sanguínea em pacientes hipertensivos (Van Elswijk et al., 2003). Os inibidores da ECA comercialmente disponíveis mais conhecidos são o captopril, enalapril e o lisinopril (Marczak et al., 2003).

Os efeitos anti-hipertensivos dos inibidores da ECA estão relacionados principalmente com o decréscimo de angiotensina II, assim como com o aumento de bradicinina (Pihlanto-Leppälä et al., 1998). Conseqüentemente, há diminuição da resistência arterial periférica e das pressões arterial média, diastólica e sistólica em vários

estados hipertensivos (Gilman et al., 1991). Entretanto, o uso de drogas sintéticas pode acarretar efeitos colaterais indesejáveis, devido à sua alta atividade e especificidade (Marczak et al., 2003). Por outro lado, peptídeos com atividade inibitória da ECA têm sido isolados de várias fontes protéicas. Esses peptídeos, conhecidos como “peptídeos biologicamente ativos”, podem representar uma alternativa natural e saudável no controle e prevenção da hipertensão arterial (Vermeirssen, Camp e Verstraete, 2002).

2. Peptídeos biologicamente ativos

Além de suprir aminoácidos e energia, que são essenciais para o crescimento e manutenção do organismo, as proteínas dos alimentos representam importante fonte de peptídeos biologicamente ativos, que podem desempenhar funções diversas, como moduladores de vários processos corporais (Meisel, 1997; Li et al., 2004).

Peptídeos que apresentam atividade anti-hipertensiva (Ariyoshi, 1993), opióide (Meisel e Schlimme, 1990), imunomodulatória (Clare e Swaisgood, 2000), antioxidante (Tong et al., 2000), antimicrobial (Bellamy et al., 1992), antitrombótica (Fiat et al., 1993), hipocolesterolêmica (Zhang e Beynen., 1993), têm sido identificados em diversas fontes protéicas. Esses peptídeos estão inativos quando fazem parte da cadeia protéica, porém, tornam-se ativos quando liberados pela proteólise enzimática *in vivo* ou *in vitro*, por exemplo, durante a digestão gastrointestinal ou processamento enzimático industrial (Wu e Ding, 2002; Li et al., 2004).

As proteínas do leite são atualmente consideradas as principais fontes protéicas precursoras de peptídeos biologicamente ativos. Peptídeos derivados da hidrólise da β -caseína podem atuar no sistema imunológico, estimulando a proliferação de linfócitos humanos e a atividade fagocitária dos macrófagos. Os caseinofosfopeptídeos também derivados da hidrólise das caseínas podem formar sais organofosfato solúveis e atuar como carreadores de diferentes minerais, especialmente cálcio. Ao lado dos caseinofosfopeptídeos, há também os peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana, isolados da lactoferrina, e os peptídeos que exercem efeitos antitrombóticos, derivados da κ -caseína (Meisel, 1997).

Entre as atividades mais estudadas, está a atividade anti-hipertensiva de hidrolisados obtidos de fontes protéicas diversas. Os peptídeos inibidores da ECA são os que têm recebido maior atenção dos pesquisadores, por sua potencial habilidade em prevenir a hipertensão arterial e assim representar uma fonte para a produção de ingredientes funcionais (Li et al., 2004). Contudo, dificuldades na identificação desses peptídeos limitam o conhecimento disponível sobre a formação dos peptídeos bioativos e sua liberação das proteínas precursoras. Geralmente, muitos passos cromatográficos são necessários para purificar os peptídeos de interesse para que finalmente eles sejam identificados por espectrometria de massa (Hernández-Ledesma et al., 2004).

2.1 Peptídeos inibidores da ECA

Peptídeos inibidores da ECA derivados de proteínas alimentares foram descritos pela primeira vez por Oshima, Shimabukuro e Nagasawa (1979) que os isolaram a partir da gelatina hidrolisada com colagenase (clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3). A partir de então, houve um crescente interesse no desenvolvimento de métodos para isolar peptídeos com atividade anti-hipertensiva derivados de proteínas alimentares, como de peixe (Fujita et al., 1995); gelatina (Byun e Kim et al., 2001; Kim et al., 2001); soja (Wu e Ding 2002; Gibbs et al., 2004); zeína (Miyoshi et al., 1991); trigo (Matsui, Li e Osajima, 1999); glúten de milho (Suh, Whang e Lee, 1999); grão-de-bico (Yust et al., 2003); espinafre (Yang et al., 2004) e principalmente a partir de proteínas do leite, como caseína (Maeno, Yamamoto e Takano, 1996; Tauzin, Miclo e Gaillard, 2002) e proteínas do soro (Nurminen et al., 2000; Hernández-Ledesma, 2002; Sipola et al., 2002b).

A soja é uma valiosa fonte de peptídeos inibidores da ECA, e muitos desses peptídeos já foram isolados de hidrolisados e produtos fermentados de soja, tais como tofu (Kuba et al., 2003) e molho de soja (Kinoshita, Yamakoshi e Kikuchi, 1993). Wu e Ding (2001) observaram um decréscimo significativo na pressão arterial de SHR (38 mmHg) após um mês de administração oral diária de 100 mg/kg de peptídeos derivados da proteína de soja.

Peptídeos obtidos pela hidrólise da zeína com termolisina (EC.3.4.24.4) promoveram redução significativa na pressão arterial de SHR após 6 horas da administração oral de 5g/kg de peso corporal (Miyoshi et al., 1991). Resultados

satisfatórios em relação à atividade anti-hipertensiva também foram observados em hidrolisados de glúten de milho (Suh, Whang e Lee, 1999; Suh et al., 2003) e de trigo (Matsui, Li e Osajima, 1999).

Kapel et al. (2005) pesquisaram o efeito anti-hipertensivo do hidrolisado do concentrado protéico da alfafa. A administração oral de 500 mg/kg de peso corporal do hidrolisado promoveu redução significativa de 29 mmHg na pressão arterial de SHR após 4 horas da ingestão.

Yoshii et al. (2001) demonstraram em seus estudos que oligopeptídeos originados da hidrólise da gema do ovo de galinha inibem a atividade da ECA *in vivo e in vitro*, e previnem o desenvolvimento da hipertensão em SHR.

As proteínas do peixe vêm sendo alvo de diversas pesquisas. Segundo Sugiyama et al. (1991), após a administração de 2,0 g/kg de peso corporal do hidrolisado do músculo de sardinha, houve queda significativa na pressão arterial de SHR. Músculo do peixe bonito digerido pela termolisina, aprovado como “Foods for Specified Use”, e comercializados no Japão, mostrou atividade anti-hipertensiva significativa em SHR, após 6 horas de administração de única dose (500 mg/kg de peso corporal) do produto (Fujita et al., 1995).

Jung et al. (2006) isolaram e caracterizaram peptídeos com atividade ECA inibitória em resíduos da industrialização de linguado (*Limanda aspera*). Os resultados desse estudo mostraram que a administração oral (10mg/kg) do peptídeo purificado Tyr-Phe-Pro foi capaz de promover redução significativa de 22 mmHg na pressão arterial de SHR, no período de 3 a 9 horas após a administração oral .

De acordo com Mullally, Meisel e Fitzgerald (1996), a formação de peptídeos com atividade biológica não depende apenas da fonte protéica, a enzima utilizada é também um fator determinante. Os autores testaram a capacidade de inibição da ECA pela β -lactoglobulina intacta e hidrolisada e só detectaram inibição satisfatória após a hidrólise desta com a tripsina. As demais enzimas testadas, Corolase PP e elastase (EC.3.4.17.2), resultaram em produtos com baixo índice de inibição.

Enzimas pancreáticas, em especial a tripsina, têm sido empregadas na produção de peptídeos inibidores da ECA (Pihlanto-Leppälä, 2001). Segundo Fitzgerald e Meisel (2000), os peptídeos produzidos pela tripsina caracterizam-se pela presença na porção C-terminal de resíduos de lisina e arginina, que segundo estudos sobre estrutura e atividade da ECA, contribuem substancialmente para a potência inibitória dos peptídeos. Entretanto, outras enzimas e várias combinações enzimáticas de proteinases – incluindo alcalase, quimiotripsina pancreática e pepsina, assim como enzimas de fontes bacterianas e fúngicas – têm sido utilizadas para gerar peptídeos bioativos (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Atualmente, a alcalase é uma das enzimas mais utilizadas para obtenção de peptídeos inibidores da ECA. A alcalase é uma protease pouco específica, liberando peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos tais como Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val e Met no lado C-terminal, o que contribui para o aumento da atividade inibitória dos peptídeos. Além disso, é uma enzima que apresenta baixo custo, quando comparada à pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína (EC.3.4.22.2) e termolisina (Li et al., 2005).

A hidrólise da legumina, proteína encontrada no grão-de-bico, usando a alcalase produziu um hidrolisado com alta atividade inibitória da ECA *in vitro*, com IC₅₀ de 0,18 mg/ml (Yust et al., 2003). Li et al. (2005) demonstraram que o isolado protéico de feijão hidrolisado com alcalase apresentou forte capacidade inibitória da ECA, enquanto que o hidrolisado obtido com neutrase apresentou fraca inibição. Os índices de inibição da ECA dos hidrolisados foram de ~78% e 23.62%, respectivamente.

Costa et al. (2005) pesquisaram o efeito do concentrado protéico do soro de leite digerido com a alcalase na atividade inibitória da ECA, na regulação da pressão arterial e na função renal de SHR. O hidrolisado produzido apresentou moderada atividade inibitória da ECA *in vitro* (IC₅₀ = 0,68 mg/mL) e promoveu redução significativa de 28,09 mmHg da pressão arterial dos SHR, após seis horas da injeção intraperitoneal. Este hidrolisado também induziu redução na filtração glomerular dos animais, possivelmente devido a um efeito vasodilatador e desencadeou a atuação de mecanismos auto-reguladores de conservação de íons e fluidos corporais, evidenciados pelo aumento na reabsorção do sódio.

Os efeitos da enzima, relação enzima/substrato e tempo de hidrólise sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados têm sido descritos na literatura (Abubakar et al., 1998; Pihlanto-Leppälä et al., 2000; Kim et al., 2001). Para otimização do processo de hidrólise, a influência de outros parâmetros, como pH e temperatura de hidrólise também devem ser considerados (Van der Ven et al., 2002). Em alguns trabalhos ficou constatado que após ter alcançado um determinado grau de hidrólise, nenhum aumento adicional na atividade inibitória da ECA era observado (Mullally, Meisel e Fitzgerald, 1996).

No estudo apresentado por Li et al. (2005), a máxima atividade inibitória da ECA de hidrolisados de feijão foi alcançada em 2 horas de incubação com a enzima alcalase. Porém, com a continuação da hidrólise, a atividade inibitória diminuiu. A diminuição na atividade inibitória da ECA com a hidrólise exaustiva pela alcalase também foi observada por outros autores para as proteínas do músculo de sardinha (Matsufuji et al., 1994), de gelatina (Byun e Kim, 2001) e de grão-de-bico (Pedroche et al., 2002).

Meisel et al. (1997) (*apud* Vermeirssen et al., 2003) relataram que a atividade inibitória da ECA aumentou durante a maturação do queijo, mas decresceu com a continuação da proteólise, indicando que a degradação dos peptídeos bioativos suplantou a formação dos novos peptídeos.

Em adição ao uso de enzimas, a produção de peptídeos bioativos também pode ser feita pelo emprego da fermentação. A formação de peptídeos inibidores da ECA através da fermentação do leite tem sido relatada nos últimos anos (Hernández-Ledesma et al. 2002; Gómez-Ruiz, Ramos e Recio, 2004). Na fermentação do leite, bactérias lácticas sintetizam proteinases, as quais podem hidrolisar as proteínas do leite e liberar muitos tipos de peptídeos. Como nem todos os peptídeos são usados pelas bactérias para seu crescimento, uma grande quantidade de peptídeos podem acumular durante a fermentação (Leclerc et al., 2002).

Pesquisas demonstram que cepas de *L.helveticus* são capazes de produzir peptídeos ECA inibitórios durante a fermentação do leite ou na proteólise da caseína pela suas proteases. Os peptídeos Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro são exemplos da produção de potentes peptídeos anti-hipertensivos pela fermentação do leite com *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os efeitos anti-hipertensivos desse leite

fermentado, que já está sendo comercializado no Japão, foi demonstrado em SHR (Pan, Luo e Tanokura, 2005) e em estudos clínicos com humanos hipertensos (Seppo et al., 2003).

O peso molecular dos hidrolisados protéicos e sua sequência de aminoácidos são também fatores críticos na produção de peptídeos com atividade ECA inibitória (Byun e Kim, 2001). A maior parte dos peptídeos inibidores da ECA apresenta baixo peso molecular (geralmente < 12 aminoácidos), sendo possível concentrar as frações ativas pelo emprego da ultrafiltração com membranas (Pihlanto-Leppälä, 2001; Van Der Ven et al., 2002). Fujita et al. (1995) verificaram em seu estudo que após realizarem a ultrafiltração do “Katsuobushi” (pescado desidratado) em membrana de 3kDa, obtiveram um permeado com o dobro da atividade anti-hipertensiva em SHR, quando comparado ao hidrolisado integral.

No estudo realizado por Jung et al. (2006), o hidrolisado obtido do resíduo da industrialização de linguado foi fracionado com membranas com *cut off* de 30 a 10kDa, 10 a 5kDa e < 5kDa. O permeado do hidrolisado obtido por membranas < 5kDa foi o mais eficiente, apresentando maior atividade inibitória da ECA (68.8 %) do que os obtidos com as membranas de 30 a 10kDa (47.6 %) e 10 a 5kDa (34.5 %).

A relação entre estrutura dos peptídeos inibidores da ECA com a atividade biológica ainda não está totalmente esclarecida, contudo estes peptídeos apresentam algumas características em comum. A ligação com a ECA é fortemente influenciada pela sequência dos três últimos aminoácidos localizados no grupo carboxila terminal. A ECA parece preferir substratos ou inibidores competitivos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada), os quais podem interagir com os subsítios da ECA. Seus inibidores preferenciais são peptídeos que contêm resíduos de aminoácidos como triptofano, tirosina, fenilalanina e prolina no lado C-terminal (Ondetti e Cushman, 1982; Pihlanto-Leppälä et al., 2000).

De acordo com Mullaly, Meisel e Fitzgerald (1996), dados relacionados à estrutura e à atividade sugerem que a carga positiva ou o grupo guanidino na porção C-terminal também contribuem substancialmente para a potência ECA-inibitória de vários peptídeos. Muitos peptídeos inibidores derivados da caseína contêm arginina ou lisina na posição C-

terminal. A β -lg (f 9-14) possui lisina no lado C-terminal, que pode ter contribuído para a atividade inibitória desse peptídeo (Pihlanto-Leppälä et al., 1998).

Segundo Marczak et al. (2003) e Li et al. (2004), dependendo do tipo de interação com a ECA, os peptídeos podem ser classificados em três grupos. No primeiro estão os verdadeiros inibidores da ECA; o segundo grupo compreende os seus substratos que são convertidos pela própria ECA em fragmentos inativos com fraca ou nenhuma atividade inibitória, e no terceiro grupo estão os chamados peptídeos pró-drogas. Esses peptídeos, também substratos da ECA são convertidos pela própria ECA ou por proteases gastrintestinais em verdadeiros inibidores. Dessa forma, para discriminar os substratos dos verdadeiros inibidores, os peptídeos são geralmente preincubados com a ECA antes da medida da atividade inibitória *in vitro*. De acordo com os autores, somente verdadeiros inibidores e pró-drogas são capazes de reduzir a pressão arterial.

3. Avaliação da atividade anti-hipertensiva *in vitro*

Para a determinação da atividade da ECA *in vitro*, o método tradicionalmente empregado por pesquisadores da área de alimentos é o protocolo desenvolvido por Cushman e Cheung (1971) e modificado por Nakamura et al. (1995). Esse método é baseado na liberação de ácido hipúrico a partir do substrato hippuril-L-histidil-L-leucina (HHL), sendo esta reação catalisada pela ECA (Pihlanto-Leppälä, 2001). Durante a hidrólise do HHL pela ECA, os peptídeos com atividade inibidora da ECA são adicionados a essa reação e a atividade inibitória será expressa em percentual ou como valor IC_{50} , correspondendo à quantidade de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50% (Cushman e Cheung, 1971; Matsui, Matsufuji e Osajima, 1992). A maior desvantagem desse método é que a absorbância para determinar a concentração de ácido hipúrico pode somente ser mensurada depois da extração do produto da reação com acetato de etila. Adicionalmente, um tempo de incubação de 30 minutos é necessário para render uma quantidade satisfatória do produto, prolongando assim o experimento (Vermeirssen, Camp e Verstraete, 2002).

Outras metodologias para determinação da atividade da ECA têm sido desenvolvidas e modeladas, tendo em vista a necessidade da padronização de um método mais reprodutível. Tem sido estudada a utilização de novos substratos para a

reação, em substituição ao HHL (Cheviron et al.,2000), além da utilização da eletroforese capilar (Shihabi,1999) e da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (Wu, Aluko e Muir,2002).

Pelo método espectofotométrico descrito por Holmquist, Bünning e Riordan (1979), a inibição da ECA é mensurada usando o substrato furanacryloyl-Phe-Gly-Gly (FAPGG). Essa análise é baseada nas variações em região visível do espectro de absorção do substrato que ocorre na hidrólise do FAPGG, levando a produção do correspondente aminoácido (FA-Phe, FAP) e dipeptídeo (Gly-Gly, GG). Posteriormente, Vermeirssen, Camp e Verstraete (2002) otimizaram e validaram esse método com o uso de extrato cetônico de pulmão de coelho como fonte enzimática. Essa modificação, segundo os autores, aumentou o alcance da medição e o custo-benefício do ensaio, constituindo um instrumento seguro e rápido para triagem de peptídeos inibidores da ECA derivados de alimentos.

A atividade inibitória da ECA também pode ser determinada utilizando peptídeo do tipo Abz-YRK(Dnp)P-OH, seguindo o método descrito por Araújo et al. (2000). Esse método se baseia na hidrólise do peptídeo sintético com supressão intramolecular de fluorescência do tipo Abz-peptidil-K(Dnp)-X-OH pela ECA, o qual contém um grupo fluorescente Abz (ácido orto-amino benzóico), ligado ao grupo N-terminal do peptídeo e ao grupo apagador Dnp (2.4-dinitrofenil) incorporado ao ϵ -amino grupo de um aminoácido da cadeia peptídica. Após a hidrólise, ocorre a liberação do produto Abz-YR responsável pela fluorescência que pode ser detectada continuamente em um fluorímetro.

4. Avaliação da atividade anti-hipertensiva *in vivo*

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são utilizados como modelo para pesquisa de agentes hipertensivos *in vivo* pelas características semelhantes da hipertensão entre essa linhagem e o homem. Além do desenvolvimento da hipertensão, esses animais desenvolvem doenças cardiovasculares e sofrem influência genética e ambiental sendo sensíveis ao sódio (Yamamori, 1988; Fujita, Yamagami e Ohshima, 2001).

Karaki et al. (1990) demonstraram que uma única administração intraperitoneal ou oral de um tripeptídeo obtido do hidrolisado da caseína foi capaz de promover significativo decréscimo (34 mmHg) na pressão arterial dos SHR. A administração oral repetida de 3 % (1,8-2,0 g/kg de peso corporal/dia) do hidrolisado da caseína decresceu a pressão sanguínea em SHR, mas não em ratos normotensos.

Nurminen et al. (2000) verificaram que a administração por via subcutânea do tetrapeptídeo α -lactofina, derivado da α -lactalbumina, resultou numa queda significativa (23 ± 4 mmHg) da pressão arterial de ratos SHR. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, os autores demonstraram que os tetrapeptídeos α -lactofina e β -lactofina (derivado da β -lactoglobulina) promoveram aumento no relaxamento da artéria mesentérica isolada de SHR, implicando em uma melhora na função arterial dos animais induzida pelos tetrapeptídeos (Sipola et al., 2002a).

Murakami et al. (2004) isolaram e identificaram o tetrapeptídeo Ala-Leu-Pro-Met a partir de um hidrolisado comercial de soro de leite e estudaram seus efeitos *in vitro* e *in vivo*. Nesse estudo, a administração oral do peptídeo promoveu decréscimo de aproximadamente 21 mmHg na pressão arterial de SHR.

Abubakar et al. (1998) observaram que o concentrado protéico do soro de leite digerido com proteinase K promoveu um forte efeito depressor da pressão arterial sistólica (55 mmHg) de SHR, sendo que a maior atividade anti-hipertensiva dentre os peptídeos ativos identificados foi encontrada com o tripeptídeo Ile-Pro-Ala (β -lg f(78-80)).

Com relação a pesquisas em humanos, ainda há poucos estudos sobre o efeito anti-hipertensivo de peptídeos. Na Tabela 2 estão apresentados alguns exemplos de estudos em humanos sobre o efeito hipotensor de diferentes hidrolisados protéicos do leite e produtos fermentados. Seriya et al. (1992) (*apud* Fitzgerald, Murray e Walsh, 2004) foram os primeiros a demonstrar que o consumo de hidrolisado (20g de hidrolisado de caseína/dia) poderia reduzir tanto a pressão arterial diastólica (PAD) como na pressão arterial sistólica (PAS) de indivíduos hipertensos. Recentemente foi relatado que o tripeptídeo α_{s1} -caseína peptídeo (C12) f(23-34) do hidrolisado da caseína poderia também reduzir a pressão arterial de humanos hipertensos (Fitzgerald, Murray e Walsh, 2004). Nesse estudo, o hidrolisado contendo o C12 foi administrado (160 mg-200 mg/kg de peso

corporal) diariamente a voluntários por 4 semanas, resultando num decréscimo da pressão arterial entre 4 e 6 mmHg (Tabela 2). O efeito anti-hipertensivo foi observado após 2 semanas de tratamento.

Tabela 2: Efeito hipotensor de hidrolisados protéicos do leite e produtos fermentados.

Amostras	Seqüência Peptídica	Dose	Duração em Semanas	PAD ¹ (mmHg)	PAS ² (mmHg)	Referência
Caseína	-----	20 g/dia	4	-4.6	-6.6	Seriya et al (1992)
Calpis	VPP/IPP	100 mL/dia	8	-6.9	-14.1	Hata et al.,1996
Leite fermentado	VPP/IPP	150 mL/dia	8	-8.8	-14.9	Seppo et al., 2002
Leite fermentado	VPP/IPP	150 mL/dia	21	-3.6	-6.7	Seppo et al., 2003
C12	FFVAPFEVFGK	> 0.2 g/kg	4	-6.5	-4.5	Nimmagudda 2002
Biozate	Peptídeos do soro de leite	20 g/dia	6	-7.0	-11.0	Pins e Kenan 2002

¹ Pressão arterial diastólica

² Pressão arterial sistólica

Fonte: Fitzgerald, Murray e Walsh (2004)

A ingestão diária por oito semanas de 100 mL de leite fermentado por *L.helveticus* contendo dois potentes peptídeos inibidores da ECA, Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro produziu significativa redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos comparado ao grupo controle, que ingeriu leite acidificado artificialmente (Hata et al.,1996). Em outros dois estudos independentes sobre a ingestão do leite fermentado por *L.helveticus* (150 mL/dia) contendo quantidades similares de Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, um potente efeito hipotensor foi relatado após 8 semanas, ao contrário do observado em 21 semanas de ingestão do leite fermentado (Seppo et al., 2002; Seppo et al., 2003)(Tabela 2).

Há evidências que o consumo de hidrolisados protéicos de soro de leite também produza redução significativa na pressão arterial. No estudo realizado por Pins e Kenan (2002) (*apud* Fitzgerald, Murray e Walsh, 2004), o hidrolisado do soro de leite (20g/dia) foi administrado oralmente a 30 homens e mulheres por um período de 6 semanas. Os autores observaram que a redução na PAS e PAD ocorreu uma semana após a ingestão dos hidrolisados, persistindo por mais 5 semanas de estudo (Tabela 2).

Um aspecto importante das triagens *in vivo* é que o consumo de hidrolisados ou produtos fermentados não possui efeitos na pressão arterial de ratos ou humanos

normotensos. Além disso, nenhum efeito adverso tem sido relatado após a ingestão oral de diversos produtos testados (Fitzgerald, Murray e Walsh, 2004).

5. Biodisponibilidade de peptídeos inibidores da ECA

Para a utilização do hidrolisado ou peptídeo como alimento funcional, não é suficiente que este seja um potente inibidor da ECA. Para desempenhar o efeito anti-hipertensivo, o peptídeo precisa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, ser absorvido e atingir a ECA que está localizada em diferentes tecidos, principalmente no plasma e no pulmão (Meisel, 1998).

De acordo com Vermeissen, Camp e Verstraete (2004), inúmeras barreiras no corpo humano, tais como a absorção intestinal e a degradação pelas peptidases séricas podem ativar ou inativar os peptídeos bioativos.

A digestão das proteínas inicia-se no estômago pela ação da pepsina em pH ácido. No intestino delgado, os polipeptídeos são clivados pelas proteases pancreáticas, dando origem a uma mistura de oligopeptídeos e aminoácidos livres. Os aminoácidos livres são absorvidos para dentro dos enterócitos, através da membrana intestinal. Já os oligopeptídeos são hidrolisados pela ação de peptidases localizadas nas bordas em escova da membrana intestinal (Vermeissen, Camp e Verstraete 2004). Essas peptidases clivam aminoácidos livres ou dipeptídeos no resíduo N- ou C- terminal ou no interior das ligações do oligopeptídeos (Kenny e Maroux, 1982; Erickson et al., 1989). Peptídeos que não são degradados pela proteólise intestinal podem, em princípio, ser absorvidos intactos e entrar na circulação sanguínea. Di e tripeptídeos – tais como imunopeptídeos e muitos peptídeos ECA inibitórios – podem passar pela membrana intestinal em quantidades significativas para atingir os seus alvos periféricos. Depois da absorção no trato intestinal, peptidases séricas também podem hidrolisar ligações peptídicas. A resistência à degradação pelas peptidases pode, de fato, ser um pré-requisito para os efeitos fisiológicos encontrados na ingestão oral e /ou infusão intravenosa de peptídeos biologicamente ativos (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Mullaly et al. (1997) isolaram e caracterizaram o peptídeo Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (β -LG f(142-148)), que apresentou alta efeito inibitório da ECA *in vitro*, mas o efeito

anti-hipertensivo *in vivo* desse peptídeo não foi determinado. Para avaliar o potencial desse peptídeo como agente anti-hipertensivo, Walsh et al. (2004) investigaram a estabilidade *in vitro* da β -LG f(142-148) às enzimas do trato gastrointestinal e proteinases do soro. Os resultados mostraram que o peptídeo β -LG f(142-148) foi altamente susceptível à degradação pelas enzimas do trato gastrointestinal e proteinases do soro. Assim, por não apresentar resistência à digestão, os autores concluíram que o fragmento da β -LG possivelmente não manifestaria efeito hipotensor *in vivo*, apesar de apresentar uma potente inibição da ECA *in vitro*.

Peptídeos inibidores da ECA que apresentam resíduo do aminoácido prolina, especialmente na extremidade C-terminal, são geralmente resistentes à degradação pelas enzimas digestivas. Além disso, pesquisas relatam que tripeptídeos contendo Pro-Pro na porção C-terminal parecem ser resistentes a peptidases prolina-específicas (Li et al., 2004; Vermeirssen, Camp e Verstraete, 2004). Dessa forma, considera-se que a administração oral de di e tripeptídeos com potente atividade inibitória *in vitro*, especialmente aqueles contendo resíduos de prolina, podem ser absorvidos em suas formas intactas do trato gastrointestinal para a circulação sanguínea e exercer atividades anti-hipertensivas (Li et al., 2004). Masuda, Nakamura e Takano (1996) observaram que dois tripeptídeos com atividade anti-hipertensiva (Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro) foram absorvidos diretamente sem serem fragmentados pelas enzimas digestivas, atingindo a aorta abdominal, inibindo a ECA e finalmente mostrando efeitos anti-hipertensivos em SHR.

Como mostrado em diversos estudos (Suh, Whang e Lee, 1999; Yamamoto, Maeno, Takano, 1999; Fujita, Yokoyama e Yoshikawa, 2000; Murakami et al, 2004), é muito difícil estabelecer uma relação direta entre a atividade anti-hipertensiva *in vitro* e *in vivo* dos peptídeos inibidores da ECA. Por exemplo, alguns peptídeos com elevada atividade ECA inibitória *in vitro* podem ser inativados após a administração oral ou intravenosa. Fujita et al. (1995) não obtiveram boa correlação entre a inibição da ECA *in vitro* e a redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos. A hidrólise do produto de pescado “Katsuobushi” pela ação da termolisina e do sistema pepsina-tripsina-quimiotripsina resultou em dois produtos com potente ação inibitória da ECA, com IC_{50} de 29 μ g/ml e 41 μ g/ml. No entanto, apenas o hidrolisado produzido pela termolisina reduziu significativamente (45 mmHg) a pressão arterial de SHR. Murakami et al. (2004)

pesquisaram a atividade anti-hipertensiva de 12 tipos de hidrolisados protéicos comerciais de diferentes fontes protéicas. Os hidrolisados derivados do soro de leite e ovoalbumina foram os que apresentaram os maiores índices de inibição da ECA (78,2 %), porém somente o hidrolisado do soro de leite foi capaz de promover um decréscimo significativo (21 mmHg) na pressão arterial de SHR. Resultados similares também têm sido relatados por outros autores (Abubakar et al., 1998; Saito et al., 2000). Esses peptídeos podem ser digeridos em fragmentos inativos ou aminoácidos quando administrados oralmente, ou ainda podem servir de substrato para a ECA, embora eles aparentemente mostrem atividade ECA inibitória, originando peptídeos com fraca ou nenhuma atividade inibitória (Li et al., 2004).

Por outro lado, muitos peptídeos com fraca atividade inibitória *in vitro* mostraram forte atividade anti-hipertensiva após administração oral ou intravenosa. Uma explicação para esse fenômeno é que esses peptídeos, fracos inibidores da ECA podem ser convertidos em fortes inibidores pelas proteases gastrintestinais *in vivo* e assim serem absorvidos na forma intacta para exibirem seus efeitos anti-hipertensivos (Li et al., 2004). Yamamoto, Maeno, Takano (1999) identificaram um dipeptídeo anti-hipertensivo Tyr-Pro num produto semelhante ao iogurte fermentado por *L. helveticus* CPN4, o qual não mostrou significativa atividade ECA inibitória *in vitro*. Similarmente, Maeno, Yamamoto e Takano (1996) demonstraram que a hidrólise com carboxipeptidase A (EC. 3.4.17.1) dos peptídeos β f(169-175) da caseína, os quais mostraram baixa atividade inibitória *in vitro* ($IC_{50} = 1000 \mu\text{mol/L}$), resultou numa significativa redução na pressão sanguínea ($31,5 \pm 5,6 \text{ mmHg}$), com ingestão oral em SHR. Esses resultados assim sugerem que enzimas digestivas podem exercer importante papel na bioatividade dos peptídeos, e que estudos *in vivo* são essenciais para confirmar o potencial desses peptídeos como ingredientes nutracêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAÚJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N- terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v.39, n.29, p.8519-8525, 2000.

ARIYOSHI, Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. **Trends in Food Sciences e Technology**, v.4, n.5, p. 139-144, 1993.

BELLAMY, W.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K.; KAWASE, K.; SHIMAMURA, S.; TOMITA, M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin, **Biochimica Biophysiology Acta**, v.1121, p.130-136, 1992.

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

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

CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H.E. Bioactive milk peptide: a prospectus. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.6, p.1187-1195, 2000.

COSTA, E. L.; ALMEIDA, A. R.; NETTO, F. M.; GONTIJO, J. A. R. Effect of intraperitoneally hydrolysed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.12, p.1817-1824, 2005.

COSTA, E. L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. **Tese de Doutorado em Alimentos e Nutrição** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

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

DÓREA, E. L.; LOTUFO, P. A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. **Hipertensão**, v.7, n.3, p. 86-89, 2004.

ERICKSON, R.H.; SONG, I.S.; YOSHIOKA, M.; GULLI, R.; MIURA, S.; KIM, Y.S. Identification of proline-specific carboxypeptidase localized to brush border membrane of rat small intestine and its possible role in protein digestion. **Digestive Diseases e Sciences**, v.34, n.3, p.400-406, 1989.

FIAT, A. M.; MILGLIORE-SAMOUR, D.; JOLLÈS, P.; DROUET, L.; SOLLIER, C. B. D; CAEN, J. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.1, p. 301-310, 1993.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **British Journal of Nutrition**, v.84, suppl. 1, p. S33-S37, 2000.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A.; WALSH, D. J. Hipotensive peptides from milk proteins. **Journal of Nutrition**, v.134, n.4, p. 980S-988S, 2004.

FUCHS, S. C.; CASTRO, M. S.; FUCHS, F. C. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo. **Hipertensão**, v.7, n.3, p. 90-93, 2004.

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

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

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

GIBBS, B. F.; ZOUGMAN, A.; MASSE, R.; MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v.37, n.2, p.123-131, 2004.

GILMAN, G. A.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 8^a ed. Rio de Janeiro, 1991. 1232p.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v.14, n.2, p.1075-1080, 2004.

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

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

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; RECIO, I. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. **International Dairy Journal**, v.14, n.10, p.889-898, 2004.

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. **International Dairy Journal**, v.12, n.10, p.805-812, 2002.

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

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

JNC 7. **The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure**. NIH publication, n.03-5233, may. 2003.

JNC 6. **The sixth report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure.** NIH publication, nov.1997.

JUNG, W. K.; MENDIS, E.; JE, J. Y; PARK, P. J.; SON, B. W.; KIM, H. C.; CHOI, Y. K.; KIM, S. K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v.94, n.1, p. 26-32, 2006.

KAPEL, R.; CHABEAU, A.; LESAGE, J.; RIVIERE, G.; RAVALLEC-PLE, R.; LECOUTURIER, D.; WARTELLE, M.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P. Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfafa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.120-126, 2006.

KARAKI, H.; DOI, K.; SUGANO, S.; UCHIWA, H. SUGAI, R.; MURAKAMI, U.; TAKEMOTO, S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.96 C, p.367-371, 1990.

KENNY, A. J.; MAROUX, S. Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. **Physiological Reviews**, v. 62, p. 91-127, 1982.

KIM, S. K.; BYUN, H. G.; PARK, P. J.; SHAHIDI, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skim gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n.6, p.2992–2997, 2001.

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

KUBA, M.; TANAKA, K.; TAWATA, S.; TAKETA, Y.; YASUDA, M. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.67, n.6, p.1278-1283, 2003.

LECLERC, P. L.; GAUTHIER, S. F.; BACHELARD, H.; SANTURE, M.; ROY, D. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v.12, n.12, p.995-1004, 2002.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R. QIZILBASH, N. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v.360, p. 1903-1913, 2002.

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 Science Technology International**, 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. **Nutrition Research**, v.24, n.7, p.469- 486, 2004.

MAENO, M.; YAMAMOTO, N.; TAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.8, p.1316-1321, 1996.

MARCZAK, E. D.; USUI, H.; FUJITA, H.; YANG, Y.; YOKKO, M.; LIPKOWSKI, A. W.; YOSHIKAWA, M. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. **Peptides**, v.24, n.6, p.791-798, 2003.

MASUDA, O.; NAKAMURA, Y. ;TAKANO, Anti-hypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, v.126, p. 3063-3068, 1996

MATSUFUJI, H.; MATSUI, T.; SEKI, E.; OSAJIMA, K.; NAKASHIMA, M.; OSAJIMA, Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in na alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.12, p.2244-2245, 1994.

MATSUI, T.; LI, C. H.; OSAJIMA, Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin-I-converting enzyme inhibition from wheat germ. **Journal Peptide Science**, v.5, n.7, p.289-297,1999.

MATSUI, T.; MATSUFUJI, H.; OSAJIMA, Y. Colorimetric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.3, p.517-518, 1992.

MATSUI, T.; YUKIYOSHI, A.; DOI, S.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, K. Gastrointestinal enzyme produciton of bioactive peptides from royal jelly protein and their

antihypertensive ability in SHR. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.13, p.80-86, 2002.

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

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

MEISEL, H.; SCHLIMME, E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. **Trends in Food Sciences e Technology**, v.1, n.1, p.41-43, 1990.

MIYOSHI, S.; ISHIKAWA, H.; KANEKO, T.; FUKUI, F.; TANAKA H.; MARUYAMA, S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.5. p. 1313-1318, 1991.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulina. **FEBS Letters**, v.402, n.2-3, p. 99-101, 1997.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FRITZGERALD, R. J. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Biological and Biochemical Hoppe-Seyler**, v.377, p.259-260, 1996.

MURAKAMI, M.; TONOUCHI, H.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; NEGISHI, H.; SAITO, T. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.7, p.1967-1974, 2004.

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

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

ONDETTI, M. A.; CUSHMAN, D. W. Enzyme of the renin-angiotensin system and their inhibitors. **Annual Review in Biochemistry**, v. 51, p.283-307, 1982.

OSHIMA, G.; SHIMABUKURO, H.; NAGASAWA, K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. **Biochimica Biophysiology Acta**, v. 566, p.128-137, 1979.

PAN, D.; LUO, Y. TANOKURA, M. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM 1004. **Food Chemistry**, v. 91, n.1, p. 123-129, 2005.

PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.9, p.960-965, 2002.

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

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; KOSKINEN, P.; PIILOLA, K.; TUPASELA, T.; KORHONEN H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. **Journal of Dairy Research**, v.67, n. 1, p.53-64, 2000.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, v.8, n.4, p. 325-331, 1998.

POZZAN, R., BRANDÃO, A. A., MAGALHÃES, M. E., FREITAS, E.V., BRANDÃO, A. P. O controle da pressão arterial como questão central no tratamento da hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.10, n.4, p. 253-259, 2003.

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H. ; KAWAI, Y.; ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.7, p. 1434-40, 2000.

SEPPO, L.; JAUHAINEN, T.; POUSSA, T.; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.7, p. 326-330, 2003.

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

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

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

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

SUGIYAMA, K.; TAKADA, K.; EGAWA, M.; YAMAMOTO, I.; ONZAKA, H.; OBA, K. Hypotensive effect of fish protein hydrolysate. **Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science**, v. 65, n.1, p.35-43, 1991.

SUH, H. J., WHANG, J. H.; KIM, Y. S.; BAE, S. H.; NOH, D. O. Preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from corn gluten. **Process Biochemistry**, v.38, n.8, p.1239-1244, 2003.

SUH, H.J., WHANG, J.H.; LEE, H. A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I-converting enzyme. **Biotechnology Letters**, v.21, n.12, p. 1055-1058, 1999.

TAUZIN, J.; MICLO, L.; GAILLARD. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{s2} -casein. **FEBS Letters**, v.531, n.2, p. 369-374, 2002.

TONG, L. M.; SASAKI, S.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p.1473-1478, 2000.

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

VAN ELSWIJK, D. A. ; DIEFENBACH, O.; VAN DER BERG, S. ; IRTH, H.; TJADEN, U. R.; VAN DER GREEF, J. Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1020, n.1,p. 45-58, 2003.

VASAN, R. S.; LARSON, M. G.; LEIP, E. P. ; EVANS, J. C.; O`DONNEL, C. J.; KANNEL, W. B.; LEVY, D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n.18, p. 1291- 1297, 2001.

VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; DEVOS, L.; VERSTRAETE, W. Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from Batch experiment to semicontinuous model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.19, p. 5680-5687, 2003.

VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v.92, n.3, p.357-366, 2004.

VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; VERSTRAETE, W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.51, n.1,p.75-87, 2002.

WALSH, D. J.; BERNARD, H.; MURRAY, B. A.; MACDONALD, J.; PENTZIEN, A. K.; WRIGHT, G. A.; WAL, J. M.; STRUTHERS, A. D.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. In vitro generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). **Journal of Dairy Science**, v.87, n.11, p.3845-3857, 2004.

WALZEM, R. L; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B.; Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.42, n.4, p.353-375, 2002.

WILLIAMS, G. H. Doença vascular hipertensiva. In: **Harrison – Medicina Interna**, Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 1998, p.1472-1486.

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

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

WU, J.; DING, X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.1, p.501-506, 2001.

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

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

YANG, Y.; MARCZAK, E. D.; USUI, H.; KAWAMURA, Y.; YOSHIKAWA, M. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.8, p.2223-2225, 2004

YOSHII, H.; TACHI, N.; OHBA, R.; SAKAMURA, O.; TAKEYAMA, H.; ITANI, T. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken eggs yolks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.128, n.1, p. 27-33, 2001.

YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, v.81, n. 3, p.363-369, 2003.

ZHANG, X.; BEYNEN, A. C. Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. **British Journal of Nutrition**, v.70, n.1, p.139-146, 1993.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE HIDROLISADOS COMERCIAIS DE DIVERSAS FONTES PROTÉICAS: INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS GASTRINTESTINAIS

RESUMO

Dentre os peptídeos bioativos, especial atenção tem sido dada aos que inibem a enzima conversora da angiotensina (ECA), que tem papel fundamental na regulação da pressão arterial. Para a utilização do hidrolisado ou peptídeo como alimento funcional, não é suficiente que este seja um potente inibidor da ECA. Para desempenhar o efeito anti-hipertensivo, o peptídeo precisa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, ser absorvido e atingir a ECA que está localizada em diferentes tecidos, principalmente no plasma e no pulmão. Desta forma, nem sempre há correspondência entre os resultados de inibição da ECA e os de redução da pressão arterial. O presente estudo teve como objetivos: avaliar a influência das enzimas do trato gastrointestinal na atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos e sua correlação com a atividade anti-hipertensiva avaliada *in vivo*; avaliar o efeito anti-hipertensivo de hidrolisados de diferentes fontes. Utilizou-se hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas: caseína (Hyprol 8052), soro de leite (Hyprol 3301) e glutén de trigo (Hyprol 4137) fornecidos pela Kerry Bio-Science; caseína (CE90ACE), soro de leite (WE80BG) e soja (SE50BT), doados pela DMV International e colágenos hidrolisados de origem bovina e suína (Gelita South América). Os colágenos hidrolisados foram fracionados em sistema de ultrafiltração com membranas de *cut off* de 30 a 50 kDa, 5 a 8 kDa e 1 a 2 kDa, obtendo-se os permeados P1 (PM< 30-50kDa), P2 (PM< 5-8kDa) e P3 (PM< 1-2 kDa), respectivamente. Os hidrolisados foram caracterizados físico-quimicamente e em seguida analisados quanto à capacidade de inibição da ECA e atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) por via oral. Para verificar a estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA ao processo digestivo no trato gastrointestinal, os hidrolisados e frações foram submetidos à hidrólise com as enzimas pepsina e pancreatina. Os digeridos obtidos neste processo foram caracterizados e avaliados quanto alterações na capacidade inibitória da ECA *in vitro*. Os colágenos hidrolisados bovino e suíno e suas frações, tanto antes como após a digestão gastrointestinal *in vitro*, apresentaram menor atividade inibitória da ECA do que os hidrolisados de outras fontes. O tratamento

enzimático promoveu aumento significativo da potencia inibitória da ECA dos colágenos hidrolisados bovino e suíno e suas frações. Por outro lado, observou-se redução na capacidade de inibir a ECA dos hidrolisados com menor peso molecular como os hidrolisados da caseína (Hyprol 8052 e CE90ACE), soro de leite (Hyprol 3301) e soja (SE50BT). Independente da fonte protéica, todos os hidrolisados analisados foram capazes de induzir redução significativa da pressão arterial de SHR, exceto os colágenos hidrolisados bovino (CHB) e suíno (CHS) não fracionados. A ultrafiltração dos colágenos hidrolisados implicou em aumento da potência inibitória da ECA, bem como maior eficiência em reduzir a pressão arterial dos animais. Dentre os produtos analisados, os hidrolisados do soro de leite (WE80BG), caseína (CE90ACE), fração P1 do colágeno bovino e suíno (CHBP1 e CHSP1) e a fração P3 do colágeno hidrolisado suíno (CHSP3) foram os que apresentaram melhor atividade anti-hipertensiva *in vivo*, promovendo máxima redução na pressão arterial de 21,16 mmHg, 25,83 mmHg, 22 mmHg, 21,33 mmHg e 21,33 mmHg, respectivamente. Ao comparar os resultados obtidos *in vivo* com os valores de IC₅₀ antes e após a hidrólise gastrintestinal, observou-se que não houve concordância entre a eficiência em inibir a ECA *in vitro* e a redução da pressão arterial *in vivo* dos hidrolisados protéicos comerciais. Esses resultados sugerem que as enzimas gastrintestinais exercem grande influência sobre atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados. Contudo, predizer o efeito dessas enzimas em produtos contendo peptídeos de tamanho e seqüências variadas é praticamente impossível, sendo o experimento *in vivo* um método mais confiável para avaliar a atividade biológica desses hidrolisados.

**IN VITRO AND IN VIVO ASSESSMENT OF THE ANTI-HYPERTENSIVE
ACTIVITY OF COMMERCIAL HYDROLYSATES FROM VARIOUS PROTEIN
SOURCES: INFLUENCE OF GASTROINTESTINAL ENZYMES**

ABSTRACT

Amongst the bioactive peptides, special attention has been given to those that inhibit the angiotensin-converting enzyme (ACE), which plays an important role in regulating blood pressure. However, to use such a hydrolysate or peptide as a functional food, it is not enough for it to simply be a potent ACE inhibitor. In order to carry out an anti-hypertensive effect, the peptide must also be resistant to the gastrointestinal enzymes and be absorbed onto and attack ACE located in different tissues, principally in the plasma and lungs. Thus there is not always correspondence between the results of ACE inhibition and those of blood pressure reduction. The objectives of the present study were: assess the influence of gastrointestinal enzymes on the ACE-inhibitory action of protein hydrolysates and their correlation with anti-hypertensive activity assessed *in vivo*; evaluate the anti-hypertensive effect of hydrolysates from different sources. Commercial hydrolysates from the following protein sources were used: casein (Hyprol 8052), milk whey (Hyprol 3301) and wheat gluten (Hyprol 4137), all provided by Kerry Bio-Science; casein (CE90ACE), milk whey (WE80BG) and soy (SE50BT), donated by DMV International, and hydrolysed collagens of bovine and porcine origins (Gelita South America). The hydrolysed collagens were fractionated in an ultrafiltration system using membranes with cut-offs of 30 to 50 kDa, 5 to 8 kDa and 1 to 2 kDa, obtaining the permeates P1 (PM<30-50kDa), P2 (PM<5-8kDa) and P3 (PM<1-2kDa), respectively. The hydrolysates were physicochemically characterised and analysed for their ACE-inhibitory capacity and anti-hypertensive activity in spontaneously hypertensive rats (SHR) via oral. To verify the stability of the ACE-inhibiting peptides to the digestive process in the gastrointestinal tract, the hydrolysates were hydrolysed with the enzymes pepsin and pancreatin. The digested preparations thus obtained were characterised and assessed for alterations in their *in vitro* ACE-inhibitory capacity. The hydrolysed bovine and porcine collagens and their fractions, both before and after *in vitro* gastrointestinal digestion, presented lower ACE-inhibitory activity than the hydrolysates from other sources. The enzyme treatment promoted a significant increase in the ACE-inhibitory potency of the hydrolysed bovine and porcine collagens and their fractions although there was a reduction in the ACE-inhibitory capacity of the lower

molecular weight hydrolysates, such as those from casein (Hyprol 8052 and CE90ACE), milk whey (Hyprol 3301) and soy (SE50BT). Independent of their protein source, all the hydrolysates analysed were capable of inducing a significant reduction in the blood pressure of SHR, except for the non-fractionated bovine (BCH) and porcine (PCH) collagen hydrolysates. Ultrafiltration of the collagen hydrolysates resulted in an increase in the ACE-inhibitory potency and in greater efficiency in reducing the blood pressure of the animals. Of the products analysed, the milk whey (WE80BG) and casein (CE90ACE) hydrolysates, P1 fractions of bovine and porcine collagen (BCHP1 and PCHP1) and the P3 fraction of the porcine collagen hydrolysate (PCHP3) were those presenting the best anti-hypertensive activity *in vivo*, promoting a maximum reduction in blood pressure of 21.16 mmHg, 25.83 mmHg, 22 mmHg, 21.33 mmHg and 21.33 mmHg, respectively. On comparing the results obtained *in vivo* with the IC_{50} values, before and after gastrointestinal hydrolysis, there was a lack of concordance between the *in vitro* ACE-inhibitory efficiency and the *in vivo* reduction in blood pressure for the commercial protein hydrolysates. These results suggest that the gastrointestinal enzymes exert considerable influence on the anti-hypertensive activity of the hydrolysates. However, predicting the effects of these enzymes on products containing peptides of varying size and sequence is practically impossible, the *in vivo* experiment being the more reliable method to assess the biological activity of these hydrolysates.

1. INTRODUÇÃO

A importância clínica da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi reconhecida após a descoberta de que seus inibidores específicos podem funcionar como drogas potenciais no combate à hipertensão. O uso de drogas sintéticas no controle da hipertensão pode acarretar efeitos colaterais indesejáveis, como tosse, alterações do paladar, hiperpotassemia, riscos durante a gravidez, entre outros inconvenientes (Marczak et al., 2003). Diante disso, nesta última década, pesquisas têm-se voltado para a busca de alimentos com propriedades funcionais, conceituados como aqueles que possuem, além de sua função nutritiva, propriedades que reduzem o risco e auxiliam no tratamento de diversas patologias crônico-degenerativas, incluindo a regulação da pressão sanguínea. Neste cenário, surgiu o interesse na identificação de alimentos protéicos como fontes de inibidores da ECA (De Felice, 1995; Yamamoto, 1997; Sloan, 2000).

Peptídeos inibidores da ECA são peptídeos bioativos com potencial propriedades anti-hipertensivas *in vivo* (Vermeirssen et al, 2004). Para a utilização de hidrolisados ou peptídeos como alimento funcional não é suficiente que este seja um potente inibidor da ECA. Para desempenhar o efeito anti-hipertensivo, o peptídeo precisa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal e peptidases da membrana intestinal, ser absorvido e atingir a ECA que está localizada em diferentes tecidos, principalmente no plasma e no pulmão (Meisel, 1998). Desta forma, nem sempre há correspondência entre os resultados de inibição da ECA e os de redução da pressão arterial. Apesar disto, grande parte dos estudos sobre produção e/ou isolamento de peptídeos com propriedades anti-hipertensivas tem utilizado a inibição da ECA para avaliar potencial funcional dos produtos (Van der Ven et al., 2002; Vermeirssen et al., 2003; Gómez-Ruiz et al., 2004; Hernández-Ledesma et al. 2005).

Em alguns trabalhos, a partir dos resultados obtidos *in vitro*, em geral reportados como IC₅₀, produtos são escolhidos para avaliação *in vivo*, utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Marczak et al., 2003; Yang et al., 2004; Jung et al., 2006). Fujita, Yokoyama e Yoshikawa (2000) classificaram o potencial funcional de hidrolisados protéicos de diversas fontes pela sua estabilidade à ação da ECA. Wu e Ding (2002) e Vermeirssen et al (2003) sugeriram que a digestão *in vitro* destes hidrolisados ou

peptídeos com as enzimas gastrintestinais e a posterior análise da atividade inibidora da ECA destes digeridos seriam uma boa aproximação do que ocorre *in vivo*. No entanto, esta afirmativa ainda não foi comprovada por testes *in vivo* com animais espontaneamente hipertensos. Assim, esse estudo tem como objetivos: avaliar a influência das enzimas do trato gastrintestinal na atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos e sua correlação com a atividade anti-hipertensiva avaliada *in vivo*; avaliar o efeito anti-hipertensivo de hidrolisados de diferentes fontes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para a realização deste trabalho, utilizou-se hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas. Os hidrolisados comerciais Hyprol 8052 – caseína (cód. 5Z01530, lote: 10013264), Hyprol 3301 – soro de leite (cód. 5Z10328, lote: 70000907) e Hyprol 4137 – glúten de trigo (cód. 5Z20023, lote: 10013676) foram fornecidos pela Kerry Bio-Science (New York, USA). Os hidrolisados comerciais CE90ACE – caseína (cód. QZYZ6A00A348, lote: 10211102), WE80BG – soro de leite (cód. QZYZGA00A348, lote: 10178344) e SE50BT – soja (cód. QZYZGA00A348, lote: 1023267) foram doados pela empresa DMV International (BA Veghel, Netherlands).

Foram também utilizados colágenos hidrolisados de origem bovina e suína e suas frações fornecidas pela Gelita South América (Cotia, Brasil). As frações foram obtidas utilizando sistema de ultrafiltração equipado com membranas com *cut off* de 30 a 50kDa, 5 a 8 kDa e 1 a 2kDa, obtendo-se os permeados P1 (PM< 30-50kDa), P2 (PM< 5-8kDa) e P3 (PM< 1-2 kDa), respectivamente. Os colágenos hidrolisados e suas frações foram codificados da seguinte maneira: CHB – colágeno hidrolisado bovino não fracionado; CHBP1 – colágeno hidrolisado bovino fração P1; CHBP2 – colágeno hidrolisado bovino fração P2; CHBP3 – colágeno hidrolisado bovino fração P3; CHS – colágeno hidrolisado suíno não fracionado; CHSP1 – colágeno hidrolisado suíno fração P1; CHSP2 – colágeno hidrolisado suíno fração P2; CHSP3 – colágeno hidrolisado suíno fração P3.

As enzimas utilizadas para digestão *in vitro* dos hidrolisados foram: pepsina da mucosa de estômago de porco (cód. P-7012, lote: 120K7654) e pancreatina (cód. P-1625, lote: 41K1271), adquiridos da Sigma Chemical Co., St. Louis ,MO, USA.

Para as análises de determinação da atividade anti-hipertensiva foram utilizados: enzima conversora da angiotensina (ECA) de pulmão de coelho (Sigma, cód. A6778, lote 084K1430), substrato sintético da ECA, hipuril-histidil-leucina (HHL) (Sigma, cód. H1635, lote 062K1092) e lisinopril (Medley - Linha Genérica, lote 501160). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

2.2 Métodos

2.2.1 Planejamento geral do experimento

Os hidrolisados foram caracterizados físico-quimicamente e em seguida analisados quanto à capacidade de inibição da ECA e atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) por via oral. Os hidrolisados que apresentaram as melhores atividades *in vivo*, foram avaliados quanto a sua influência na função renal dos animais e efeito hipotensor prolongado na pressão arterial de SHR, em experimento crônico (Figura 1).

Os hidrolisados e as frações também foram avaliados quanto à resistência às enzimas do trato gastrointestinal segundo o método descrito por Vermeirssen et al. (2003). Esta análise consistiu em submeter os produtos às condições do meio gástrico e pancreático e, no material digerido, pesquisar alterações na capacidade de inibir ECA (Figuras 1 e 2).

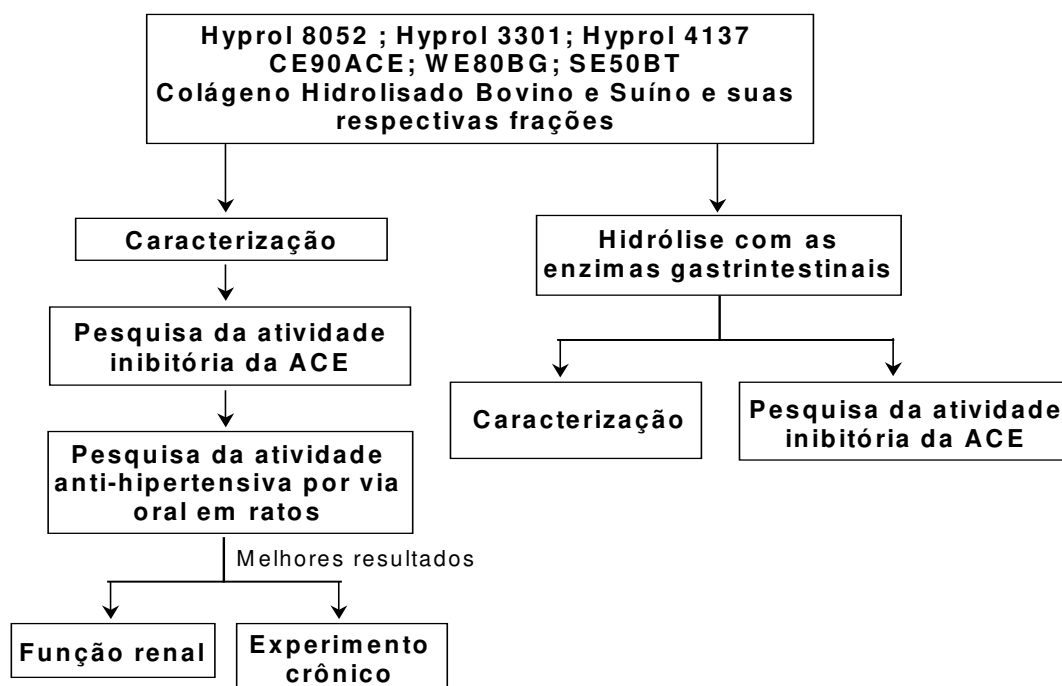


Figura 1. Fluxograma dos experimentos realizados no presente estudo.

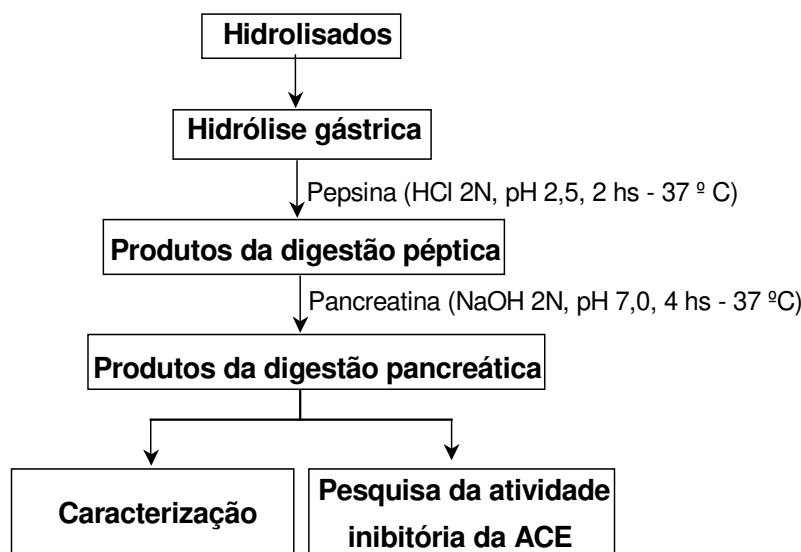


Figura 2: Seqüência de tratamentos para determinar a resistência dos hidrolisados às enzimas gástricas

2.2.2 Caracterização dos hidrolisados

O nitrogênio total foi determinado por micro-Kjeldahl (AOAC,1995). Para o cálculo da proteína bruta foram utilizados os fatores de conversão: 5,55, para os colágenos hidrolisados; 6,38, para os hidrolisados de caseína e soro de leite; 5,7 para o hidrolisado de glúten de trigo e 6,25 para o hidrolisado de soja.

2.2.2.1 Eletroforese capilar

Os perfis eletroforéticos dos hidrolisados foram determinados por eletroforese capilar, seguindo o método descrito por Pacheco, Amaya-Farfan e Sgarbieri (2002). Amostras diluídas (5 mg/ml) foram homogeneizadas, filtradas em membranas de acetato celulose 22 µm e injetadas durante 8s, com pressão de 50 mBar, em capilar de sílica fundida (60 cm x 75 µm d.i). Como fase móvel, utilizou-se tampão fosfato 50 mM, pH 2,5 e fluxo de corrente do cátodo para o ânodo.

As corridas foram conduzidas a temperatura de 30 °C em aparelho HP-3DCE (Agilent, Waldbronn, Germany), com tensão mantida a 20kV e a absorbância monitorada

a 200 nm. Entre cada análise, o capilar foi lavado com solução de hidróxido de sódio 1N e água, e em seguida, recondicionado com tampão de corrida.

2.2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil de peso molecular dos hidrolisados de colágeno e suas frações foram determinados por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida em sistema SDS-Tricina, de acordo com o procedimento descrito por Schagger e Von Jagow (1987). Para os demais hidrolisados estudados não foi possível realizar essa etapa de caracterização, por se tratar de hidrolisados com > 80% de peptídeos com baixo peso molecular (< 1 kDa).

Os hidrolisados foram diluídos em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), aquecidos a 40°C por 30 minutos. Foram utilizados gel de separação em gradiente de 10 a 16%, e gel de empacotamento com 4% de poliacrilamida. Alíquotas de 5μL da solução de cada hidrolisado foram aplicadas e após as corridas, os géis foram corados em Coomassie R-250 0,2% durante 3 horas, e descorados em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

O peso molecular das bandas foi determinado por comparação com padrão de peso molecular entre 2,5 e 16kDa (Pharmacia, cód. 80-1129-83).

2.2.2.3 Grau de Hidrólise

O grau de hidrólise dos hidrolisados protéicos foi estimado pelo método do TNBS (Adler-Nissen, 1979). Este método fundamenta-se na reação colorimétrica do ácido trinitrobenzenosulfônico com os grupos α-amino terminais das proteínas e peptídeos formados durante a reação de hidrólise.

O grau de hidrólise (GH) foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$GH = \frac{mMolLeu}{h_{tot}} \times 100$$

onde:

mMol Leu = grupamentos amínicos livres, calculados a partir da curva padrão de leucina;

h_{tot} = número de equivalentes de pontes peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de : 11,1 mM/g de proteína, para as proteínas da gelatina; 8,8 mM/g de proteína, para as proteínas do soro de leite; 8,2 mM/g de proteína, para a caseína; 7,8 mM/g de proteína, para a proteína da soja e 8,3 mM/g de proteína, para o glúten de trigo (Adler-Nissen, 1986).

2.2.2.4 Osmolalidade

A osmolalidade das soluções de hidrolisados foi determinada por crioscopia, em aparelho Advanced Wide-Range Osmometer 3WII (Needham Heights, Massachusetts), conforme Chen (1987). O método crioscópico baseia-se, no efeito das partículas de soluto sobre a pressão de vapor do solvente e proporcional diminuição do ponto de congelamento à medida que se eleva a carga de soluto (aumento do número de partículas aumenta a pressão de vapor do solvente e diminui o ponto de congelamento da solução).

2.2.3 Medida da atividade inibitória da ECA *in vitro*

A atividade inibitória da ECA dos hidrolisados foi determinada por eletroforese capilar de acordo com o método de Shihabi (1999) com modificações (Costa e Netto, 2003). A determinação do valor de IC_{50} de cada hidrolisado foi feita pela incubação do volume de 50 μ L do hidrolisado, em várias concentrações, com 100 μ L da ECA (8 mU). A ECA, o HHL e os hidrolisados foram diluídos em tampão borato de sódio 100 mM e cloreto de sódio 300 mM, pH 8,2 a 37° C, de modo que a concentração final da ECA fosse de 8 mU e do HHL 1,5 mM. Para iniciar a reação, foram adicionados 100 μ L HHL. Após 30 minutos, a enzima foi inativada pela adição de 100 μ L de acetonitrila. Após homogeneização e filtração em membrana de acetato celulose, a mistura foi então analisada por eletroforese capilar em aparelho HP-3DCE (Agilent, Waldbronn, Germany).

As amostras foram injetadas de modo hidrodinâmico com pressão de 50 mBar em capilar de sílica fundida com 40 cm de comprimento total, 32 de comprimento efetivo e 50 μ m de diâmetro interno. Como fase móvel, utilizou-se tampão borato de potássio 50 mM, pH 9,3, e fluxo de corrente do cátodo para o ânodo. A tensão de corrida foi mantida a 10 kV por 20 minutos. Os analitos foram detectados com detector de arranjo de diodos (DAD) e as áreas dos picos foram integradas pelo software HP-3DCE.

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

O valor IC₅₀ para cada hidrolisado foi determinado por análise de regressão do logaritmo da concentração do ácido hipúrico liberado na reação (área integrada no eletroforegrama) em função da concentração de hidrolisado incubado na reação (mg/mL).

2.2.4 Atividade anti-hipertensiva *in vivo*

2.2.4.1 Protocolo experimental

Para o experimento biológico, foram utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) com 4 semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo até cinco animais, em ambiente climatizado com temperatura de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ de umidade relativa, com controle automático do ciclo claro/escuro a cada 12 horas. Dieta comercial (LABINA[®]) e água foram fornecidas *ad libitum*.

Após 10 semanas de aclimação, os SHR (14 semanas de idade, com pressão arterial sistólica > 160 mmHg) foram pesados e divididos ao acaso em três grupos de seis animais cada ($n=6$): grupo experimental (E) recebeu 2mL da solução de hidrolisado; grupo controle negativo (CN), recebeu 2 mL de água destilada; grupo controle positivo (CP), recebeu o agente anti-hipertensivo lisinopril (20 mg/kg de peso corporal). A forma de administração das soluções foi por gavagem. Os grupos foram revezados aleatoriamente, com um período de descanso de uma semana entre os testes, até que todos os hidrolisados comerciais fossem testados. A pressão arterial média (PA) foi medida antes da administração dos hidrolisados (pressão basal), 1, 3 e 5 horas após a gavagem (Figura 3).

Para cada hidrolisado, obteve-se uma curva dose-resposta de redução da pressão arterial dos ratos em função da concentração do hidrolisado. As doses mais eficientes na redução da pressão arterial foram às utilizadas nas etapas subsequentes: estudo da função renal e experimento crônico.

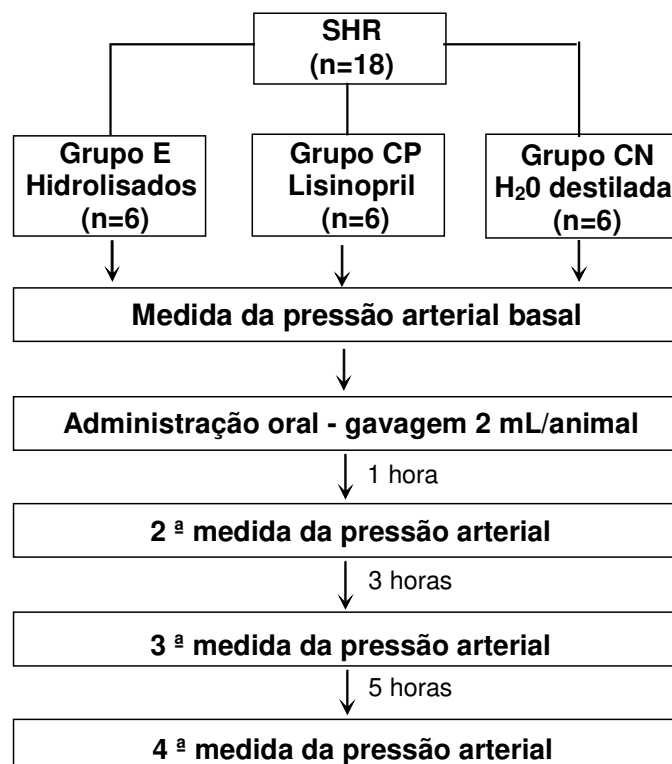


Figura 3. Fluxograma dos experimentos de determinação da pressão arterial dos ratos

O protocolo para o ensaio experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo n. 807-1).

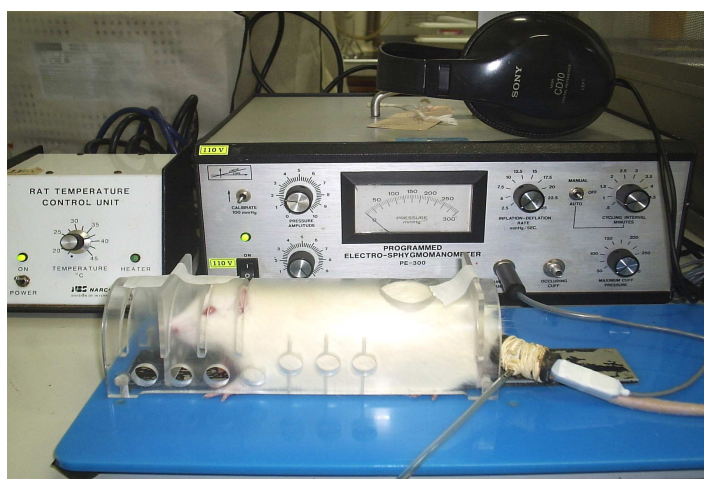
2.2.4.2 Medida da pressão arterial

A medida da PA foi realizada por pletismografia de cauda utilizando-se eletroesfigmomanômetro e transdutor de som tipo Korotkoff (Narco Biosystems Inc. Austin Tx), de acordo com o método indireto descrito por Lovenberg (1987).

Antes de proceder a medida da pressão arterial, os animais foram mantidos em caixa aquecida a 40°C durante 5 minutos (Figura 4a). Em seguida os animais foram imobilizados sobre uma placa de superfície aquecida a 37° C, onde foram realizadas três medidas consecutivas da pressão arterial caudal através de pletismografia e amplificação dos ruídos de Korotkoff por um transdutor fixado sobre a artéria caudal posterior, como mostra a Figura 4b.



(a)



(b)

Figura 4: Medida da pressão arterial. (a) Caixa para aquecer os ratos. (b) Aparelho para medir a pressão arterial em ratos

2.2.4.3 Experimento crônico

Dois hidrolisados que apresentaram os melhores resultados na análise de atividade anti-hipertensiva *in vivo* foram novamente testados, agora com o objetivo de avaliar o efeito a longo prazo desses produtos na pressão arterial de SHR.

Para o experimento crônico, foram utilizados 10 ratos machos com 28-32 semanas de vida, seguindo as mesmas condições descritas na seção 2.2.4.1. Neste caso os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos contendo cinco animais (n=5), sendo um grupo experimental, que receberam 2 mL da solução de hidrolisado e um grupo controle, que recebeu água.

O ensaio experimental foi desenvolvido com base nos procedimentos descritos por Wu e Ding (2001). A administração oral dos hidrolisados por gavagem foi realizada diariamente, obedecendo sempre o mesmo horário (entre 14:00 e 15:00 hs), durante um período de 32 dias. A pressão arterial média foi mensurada antes do início da administração dos hidrolisados (pressão basal) e a cada seis dias da administração diária do hidrolisado. Vale ressaltar que a medida da pressão arterial dos animais foi realizada sempre no período da manhã, antes da gavagem dos hidrolisados, a fim de separar o efeito agudo do crônico.

2.2.5 Estabilidade dos peptídeos com atividade inibitória da ECA à hidrólise com enzimas gastrintestinais

Para verificar a estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA ao processo digestivo no trato gastrintestinal, os hidrolisados foram submetidos à hidrólise com as enzimas pepsina (P-7012:Sigma) e pancreatina (P-1625:Sigma) de acordo com o método descrito por Vermeirssen et al. (2003b) com algumas adaptações. Soluções dos hidrolisados 4% (p/v) em HCl 2N (pH 2,5) foram equilibradas a 37° C, em banho-maria sob agitação. Em seguida, foi adicionada solução de pepsina (relação enzima/substrato: 1:100 p/v). Após 2 horas de reação, a solução foi neutralizada (pH 7,0) por adição de NaOH 2N e imediatamente foi adicionada solução de pancreatina (relação enzima/substrato: 1:50 p/v). Após 4 horas de digestão com a pancreatina, a enzima foi inativada em banho a 90°C durante 10 minutos, e em seguida a solução foi resfriada, congelada e liofilizada.

Os digeridos obtidos neste processo foram caracterizados (ver item 2.2.2), e submetidos à análise de atividade inibitória da ECA *in vitro* (procedimento descrito na seção 2.2.3).

2.2.6 Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas foram apresentados como média \pm desvio padrão e dos experimentos biológicos como média \pm erro padrão. Os dados obtidos *in vitro* foram submetidos a análise de variância ANOVA e teste de Tukey para confronto entre as médias. Já para os experimentos biológicos, as diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste *t* de *Student*. O software Statistica for Windows (1995) foi utilizado no intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos hidrolisados

O teor de proteína, o grau de hidrólise e a osmolalidade dos hidrolisados comerciais de caseína, proteínas do soro de leite, soja e glúten, antes e após o tratamento com as enzimas do trato gastrointestinal, estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os teores de proteína de todos os hidrolisados analisados, após a hidrólise gastrointestinal, foram inferiores aos dos hidrolisados antes do tratamento enzimático. Esta diferença deve-se à diluição causada pela adição de HCl e NaOH para ajuste do pH no processo de hidrólise com as enzimas gastrintestinais. Pacheco, Amaya-Farfan e Sgarbieri (2002) também reportaram diminuição do teor protéico após hidrólise enzimática.

Tabela 1: Proteína bruta, grau de hidrólise e osmolalidade dos hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas.

Amostras	Origem	Peso molecular médio (Da) ¹	Proteína (%) ²	GH (%) ²	Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O) ²
Hyprol 8052	Caseína	< 1000 (77 %)	83,71 ± 0,23	30,29 ± 0,58	190,5 ± 2,5
Hyprol 3301	Soro de leite	< 1000 (82 %)	72,83 ± 1,03	34,07 ± 0,77	231,5 ± 0,5
Hyprol 4137	Glúten de Trigo	< 1000 (95 %)	75,04 ± 0,79	10,80 ± 0,41	136 ± 0,01
CE90ACE	Caseína	< 1000 (87 %)	88,76 ± 1,14	24,09 ± 0,35	135,5 ± 0,5
WE80BG	Soro de leite	< 500 (55 %)	86,50 ± 0,21	28,00 ± 0,15	299 ± 0,01
SE50BT	Soja	< 500 (75 %)	52,80 ± 0,37	27,36 ± 0,07	213,5 ± 1,5

¹ Dados fornecidos pelo fabricante

² Resultados apresentados como média de três repetições ± desvio padrão

Tabela 2: Proteína bruta, grau de hidrólise e osmolalidade dos hidrolisados comerciais de diferentes fontes protéicas após hidrólise *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

Amostras	Origem	Proteína (%) ¹	GH (%) ¹	Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O) ¹
Hyprol 8052	Caseína	78,03 ± 0,08	31,14 ± 0,60	515,5 ± 0,5
Hyprol 3301	Soro de leite	64,22 ± 0,61	35,00 ± 0,37	496,5 ± 2,5
Hyprol 4137	Glúten de Trigo	62,47 ± 2,15	21,93 ± 0,19	264 ± 1,0
CE90ACE	Caseína	70,95 ± 0,54	33,13 ± 0,02	288 ± 0,01
WE80BG	Soro de leite	66,85 ± 1,68	36,21 ± 0,01	370 ± 0,01
SE50BT	Soja	39,57 ± 0,70	35,27 ± 1,10	380 ± 1,0

¹ Resultados apresentados como média de três repetições ± desvio padrão

De maneira geral, o tratamento com as enzimas digestivas foi efetivo, resultando em aumento do GH, indicando que houve hidrólise e peptídeos menores e/ou aminoácidos livres foram liberados. Os hidrolisados da caseína (Hyprol 8052) e do soro de leite (Hyprol 3301) foram os únicos que apresentaram comportamento diferente do que foi observado para a maioria dos hidrolisados: após a hidrólise gastrointestinal *in vitro*, praticamente não houve aumento no grau de hidrólise desses hidrolisados. O pequeno aumento do grau de hidrólise dos hidrolisados Hyprol 3301 e Hyprol 8052, após a digestão gastrointestinal, comparado aos demais hidrolisados, pode ser explicado pelo alto grau de hidrólise inicial desses produtos e/ou pela presença de seqüências de aminoácidos não compatíveis com a especificidade das enzimas digestivas utilizadas.

A osmolalidade de hidrolisados protéicos aumenta com o aumento do GH, mas como para a digestão *in vitro* foi necessário adicionar HCl e NaOH para ajuste do pH, o aumento observado da osmolaridade deve-se, em grande parte, à adição destes reagentes, que foi diferente para os diferentes hidrolisados estudados. Os macroelementos exercem efeito osmótico pronunciado, condizente com a presença de determinadas moléculas de sais que sofrem dissociação e, portanto potencializam seu efeito osmótico por íon dissociado (Henriques e Rosado, 1999) .

A osmolalidade é determinante fundamental na aceitação fisiológica da dieta. Uma carga osmolar adequada (até 400 mOsm/kg), se faz necessária para que o alimento, infundido diretamente por via nasogátrica ou nasoentérica seja tolerado pelo organismo de animais e humanos (Henriques e Rosado, 1999).

Como não havia informações sobre a distribuição de peso molecular dos hidrolisados de colágeno, a sua determinação foi realizada por eletroforese (SDS-PAGE) (Figura 5). O hidrolisado CHB apresentou distribuição de peso molecular mais ampla e com pesos moleculares mais altos que o que o CHS. A ultrafiltração do CHB com a membrana de *cut off* 30-50 kDa pouco alterou a distribuição de peso molecular enquanto que com as membranas de *cut off* 5-8 e 1-2 KDa fez com que as frações de alto peso fossem eliminadas.

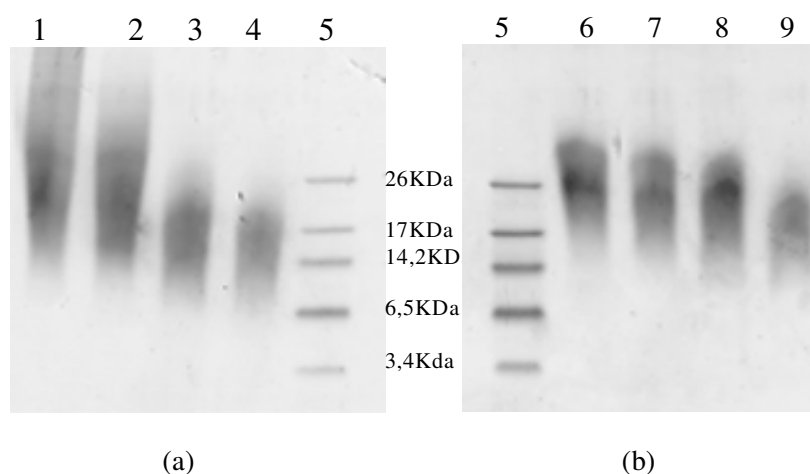


Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de colágeno bovino (a) e suíno (b). Coluna 1 – CHB; coluna 2 – Fração BP1; coluna 3 – Fração BP2; coluna 4 – Fração BP3; coluna 5 – Padrões; coluna 6 - CHS; coluna 7 - Fração SP1; coluna 8 – Fração SP2; coluna 9 – Fração SP3.

O grau de hidrólise das frações do colágeno hidrolisado bovino e suíno apresentou aumento com a ultrafiltração, inversamente proporcional ao *cut off* da membrana, indicando diminuição do tamanho médio dos peptídeos presentes. Esta diminuição refletiu-se na osmolalidade das frações, o que era esperado, já que grau de hidrólise e osmolalidade são diretamente proporcionais (Tabela 3).

Tabela 3: Proteína bruta, grau de hidrólise e osmolalidade dos colágenos hidrolisados e suas frações, antes e após hidrólise gastrintestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

Amostras	Antes da hidrólise com enzimas gastrintestinais			Após a hidrólise com enzimas gastrintestinais		
	Proteína (%) ¹	GH (%) ¹	Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O) ¹	Proteína (%) ¹	GH (%) ¹	Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O) ¹
CHB	90,80 ± 0,26	7,68 ± 0,25	60,00 ± 1,41	79,75 ± 0,65	13,48 ± 0,67	260,50 ± 2,12
CHBP1	93,16 ± 0,58	7,61 ± 0,11	68,50 ± 0,71	77,65 ± 1,71	13,64 ± 0,95	320,00 ± 1,41
CHBP2	88,19 ± 1,49	8,20 ± 1,35	74,00 ± 0,00	75,54 ± 0,9	15,23 ± 0,53	318,00 ± 0,00
CHBP3	93,75 ± 0,15	8,61 ± 0,11	110,50 ± 0,71	87,47 ± 1,50	13,95 ± 0,11	344,50 ± 0,71
CHS	90,92 ± 1,60	7,20 ± 0,03	60,50 ± 0,71	82,62 ± 0,31	13,15 ± 0,67	299,50 ± 2,12
CHSP1	93,01 ± 0,77	7,67 ± 0,11	68,50 ± 0,71	81,74 ± 0,46	13,48 ± 0,21	302,50 ± 3,54
CHSP2	92,41 ± 0,73	7,94 ± 0,11	77,00 ± 0,00	77,58 ± 0,01	14,61 ± 0,88	297,50 ± 2,12
CHSP3	92,79 ± 0,86	8,20 ± 0,78	87,50 ± 0,71	86,10 ± 0,39	14,07 ± 0,55	324,00 ± 1,41

¹ Resultados apresentados como média de três repetições ± desvio padrão

Assim como foi observado para os hidrolisados de outras fontes protéicas, após a hidrólise gastrintestinal *in vitro*, houve aumento do grau de hidrólise e osmolalidade, em todos os produtos analisados, indicando que o tratamento enzimático foi efetivo. Mesmo após a hidrólise com as enzimas gastrintestinais, os valores de GH dos colágenos hidrolisados foram inferiores aos dos outros hidrolisados estudados, indicando apenas hidrólise parcial destes produtos.

Para avaliar a estabilidade dos hidrolisados à ação das enzimas gastrintestinais, foi utilizada a técnica de eletroforese capilar, que nos últimos anos, tem se tornado um dos mais poderosos instrumentos para análise de uma grande variedade de peptídeos e misturas protéicas. Além da alta eficiência, a eletroforese capilar oferece outras vantagens na área de biotecnologia analítica, tais como baixíssimo requerimento de quantidades de amostra e rápidas separações (Rodrigues e Li, 1999).

A separação na eletroforese capilar é baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. Além da migração eletroforética dos íons, outro fenômeno de migração ocorre na eletroforese, a eletroosmose, ou seja, fluxo de solução induzido pelo campo elétrico, o qual confere à técnica parte de suas características de alta eficiência (Tavares, 1997). A caracterização de hidrolisados por eletroforese capilar realizada em condições ácidas (pH 2,5), garante que todos os peptídeos e aminoácidos livres estejam protonados e migrem na mesma direção (Janini et al., 1999).

A comparação dos eletroforegramas dos hidrolisados comerciais antes e após o tratamento com as enzimas gastrintestinais (Figuras 6 a 11), com exceção do hidrolisado SE50BT, mostra que houve redução na intensidade de picos de maior tempo de eluição, com concomitante aparecimento de novos picos com menor tempo de eluição (Figuras 6 a 10). Como a migração é dependente da relação carga/ massa dos peptídeos, a migração de peptídeos em tempos menor indica a formação de peptídeos de menor massa molecular (Panyam e Kilara, 1996). O perfil eletroforético do hidrolisado de caseína CE90ACE após o tratamento enzimático (Figura 9) foi o que apresentou alterações mais evidentes da clivagem dos peptídeos pelas enzimas gastrintestinais, com o aparecimento ou aumento da área de picos com eluição entre 12 e 17 minutos. Outras alterações, como desaparecimento de alguns picos de eluição, entre 17 a 25 minutos, também foram

observadas nos eletroferogramas dos hidrolisados da caseína (Hyprol 8052) e do soro de leite (WE80BG) após o tratamento com as enzimas gastrintestinais (Figuras 6 e 10). Interessante notar que os hidrolisados que sofreram pequena ou nenhuma alteração no GH com a hidrólise gastrintestinal, Hyprol 8052 e Hyprol 3301, apresentaram alterações em seu perfil eletroforético.

Os eletroforegramas do hidrolisado de soja SE50BT (Figura 11) apresentam grande similaridade entre os perfis, sugerindo que esse hidrolisado possa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrintestinal. Wu e Ding (2002) também observaram poucas alterações no perfil eletroforético do hidrolisado de soja antes e após o tratamento com as enzimas pepsina e pancreatina. Todavia, o hidrolisado SE50BT obteve aumento de quase 30% no GH após hidrólise com as enzimas gastrintestinais, porém não apresentou alteração em seu perfil eletroforético. Esses resultados contraditórios podem ser decorrentes de um erro analítico da caracterização por eletroforese capilar e/ ou do grau de hidrólise.

Estudos anteriores têm sugerido que pequenos peptídeos apresentam menor susceptibilidade à hidrólise pelas proteases gástricas (Grimble et al., 1987; Matews e Payne, 1980). Porém, as alterações no perfil eletroforético dos hidrolisados Hyprol 8052, Hyprol 3301, Hyprol 4137, CE90ACE e WE80BG devido à hidrólise gastrintestinal *in vitro* indicam que esses hidrolisados de baixo peso molecular não são resistentes à estas enzimas (Figuras 6 a 10).

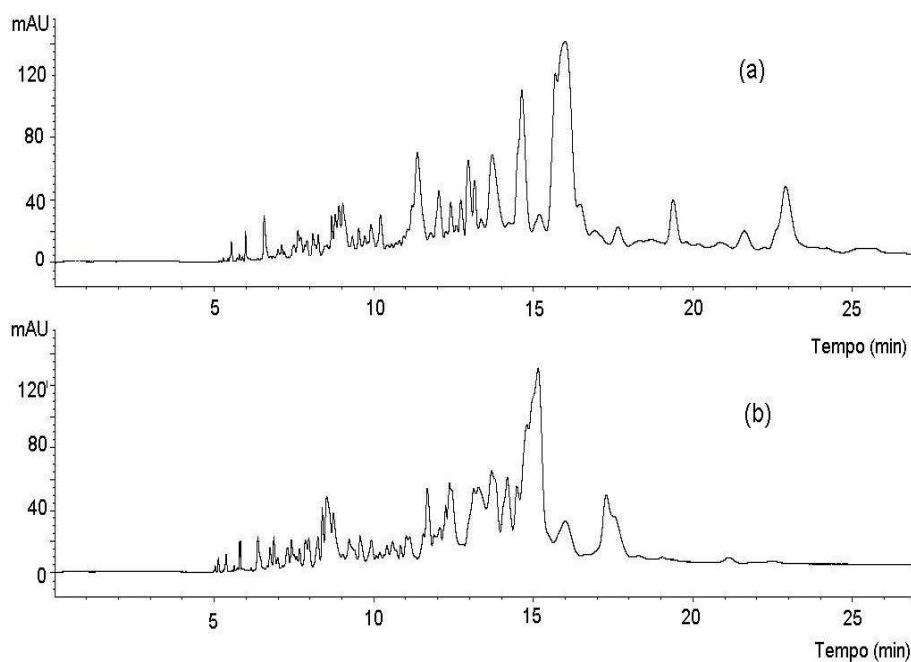


Figura 6: Eletroforegramas do hidrolisado Hyprol 8052: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

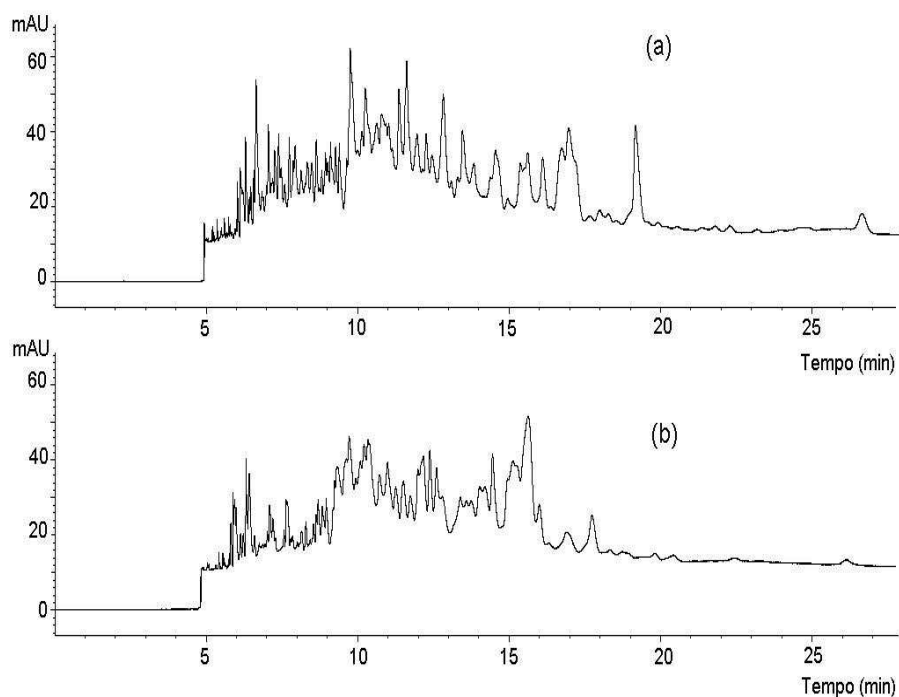


Figura 7: Eletroforegramas do hidrolisado Hyprol 3301: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

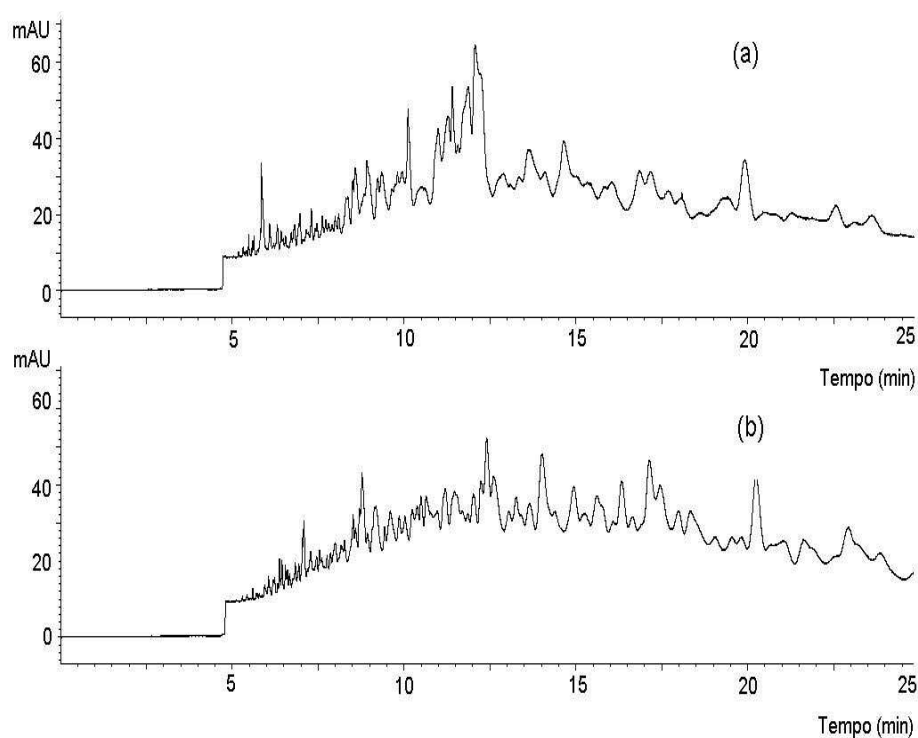


Figura 8: Eletroforegramas do hidrolisado Hyprol 4137: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

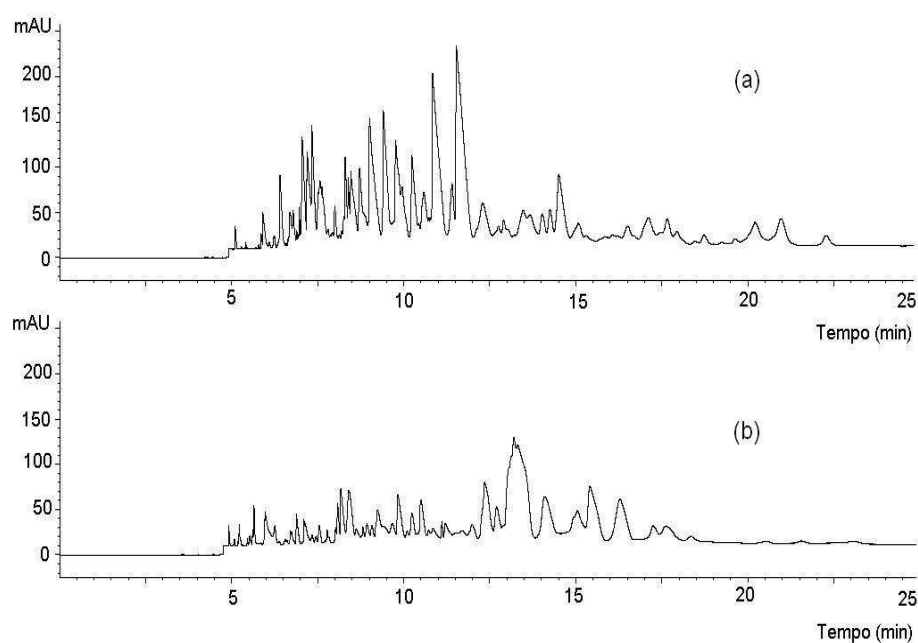


Figura 9: Eletroforegramas do hidrolisado CE90ACE: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

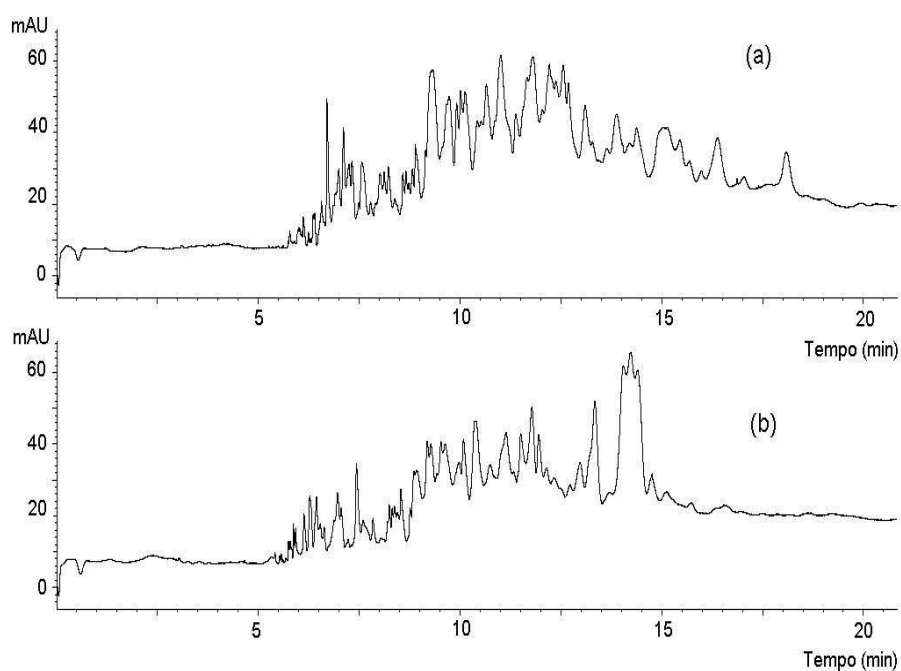


Figura 10: Eletroforegramas do hidrolisado WE80BG: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

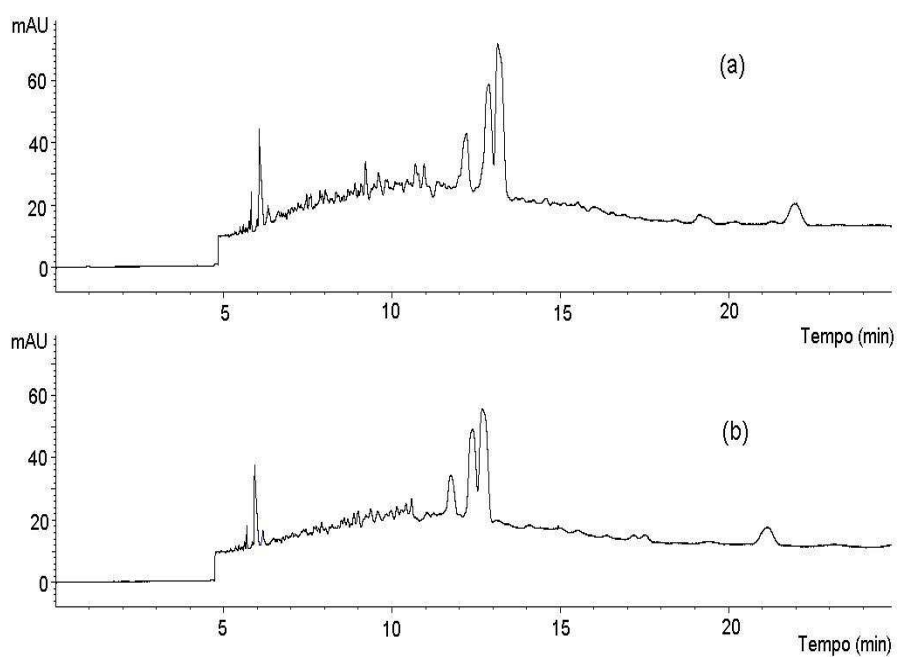


Figura 11: Eletroforegramas do hidrolisado SE50BT: (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

Os eletroforegramas dos hidrolisados de colágenos e suas frações estão apresentados nas Figuras 12 a 19. Quanto menor o peso molecular das frações, menor foi o tempo de eluição inicial dos peptídeos. O hidrolisado suíno e suas frações apresentaram picos com tempo de eluição menores que os de origem bovina. Comparando-se os eletroforegramas dos hidrolisado bovino e suíno e suas frações antes e após a hidrólise com as enzimas pepsina e pancreatina, observaram-se que houve aumento do número de picos entre 5 e 9 minutos de eluição e aparecimento de novos picos entre 10 e 15 min. A liberação de grupos amino, devido à clivagem das ligações peptídicas, que aumenta a carga e diminui o peso molecular dos peptídeos, possivelmente contribuiu para a diminuição do tempo e migração dos peptídeos para o catodo.

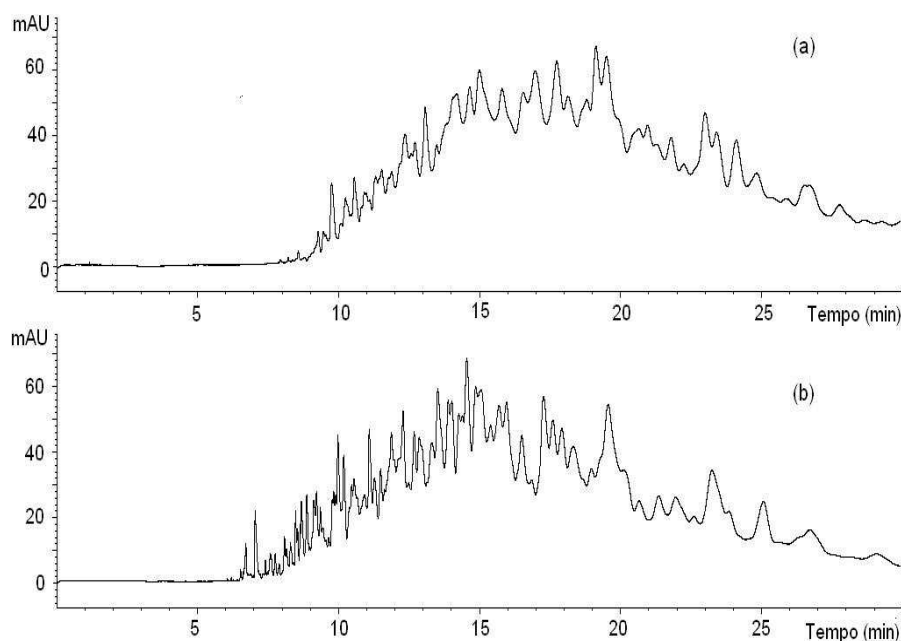


Figura 12. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

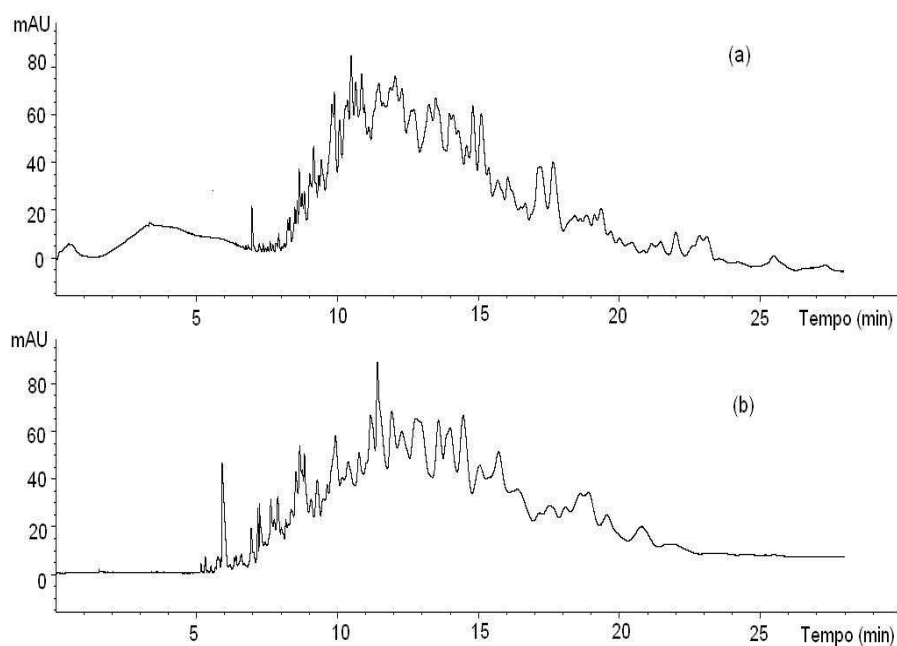


Figura 13. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino fração P1, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

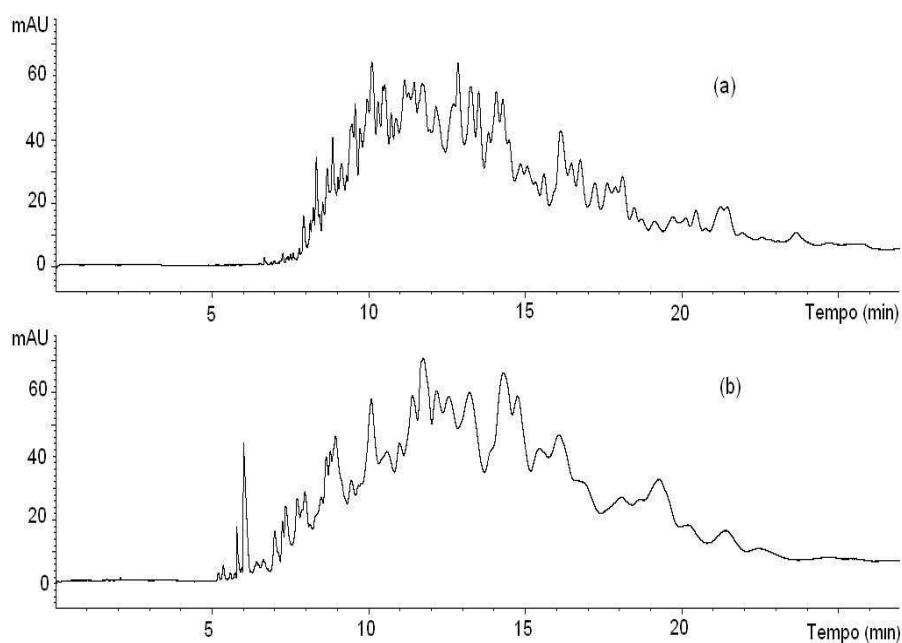


Figura 14. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino fração P2, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

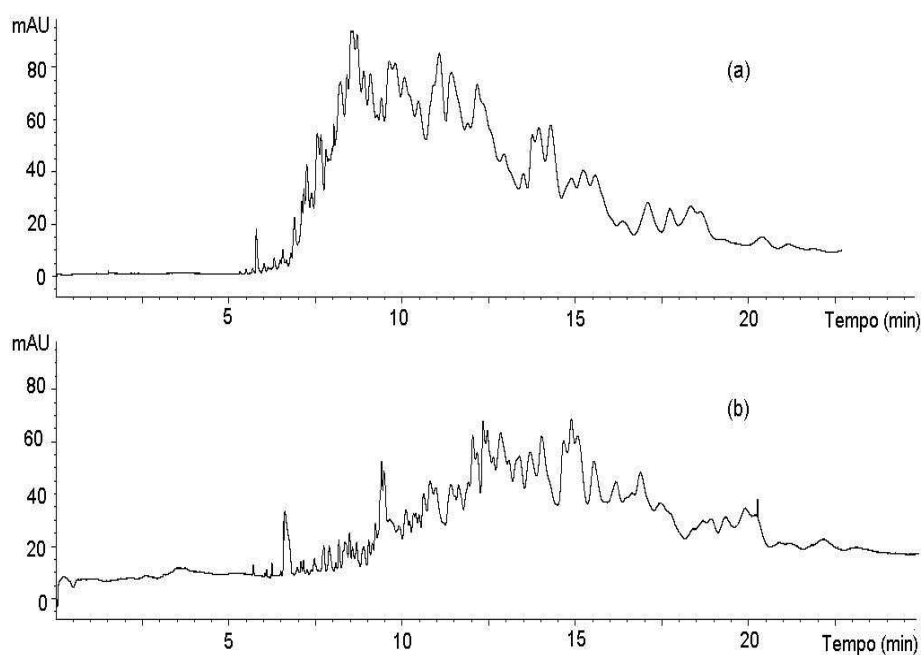


Figura 15. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado bovino fração P3, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrintestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

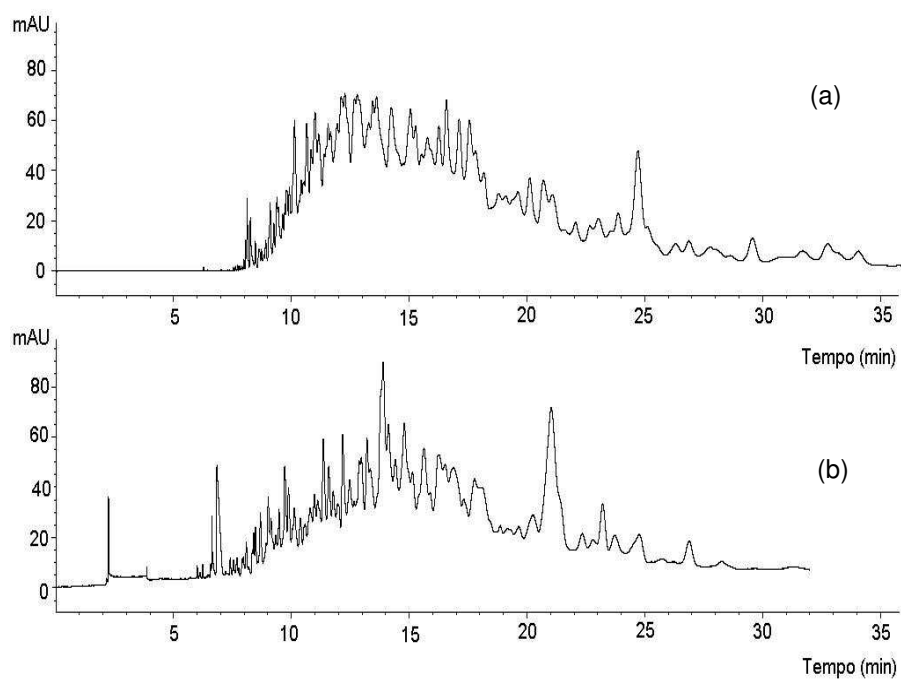


Figura 16. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrintestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

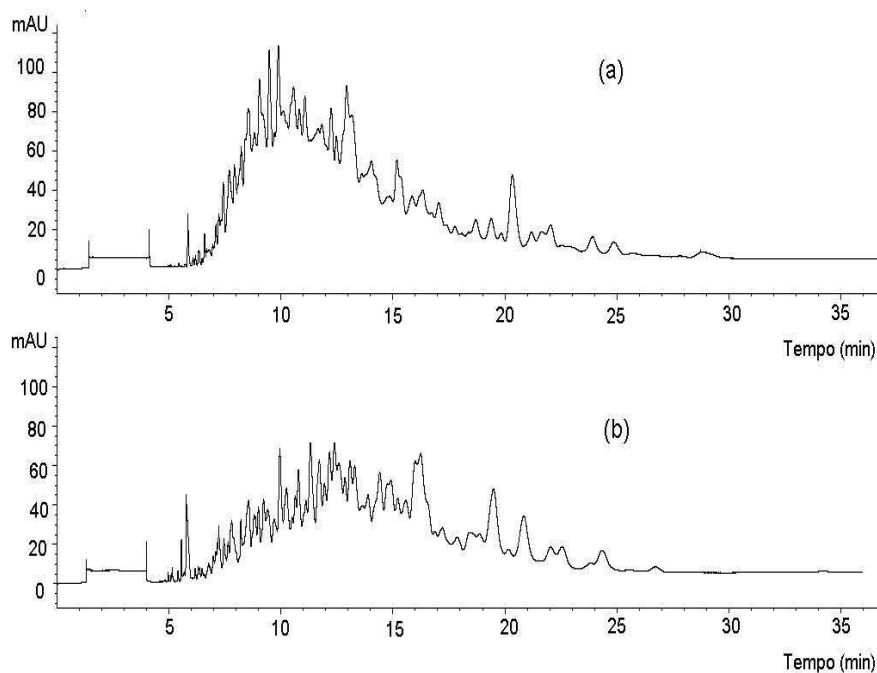


Figura 17. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno fração P1, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrintestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

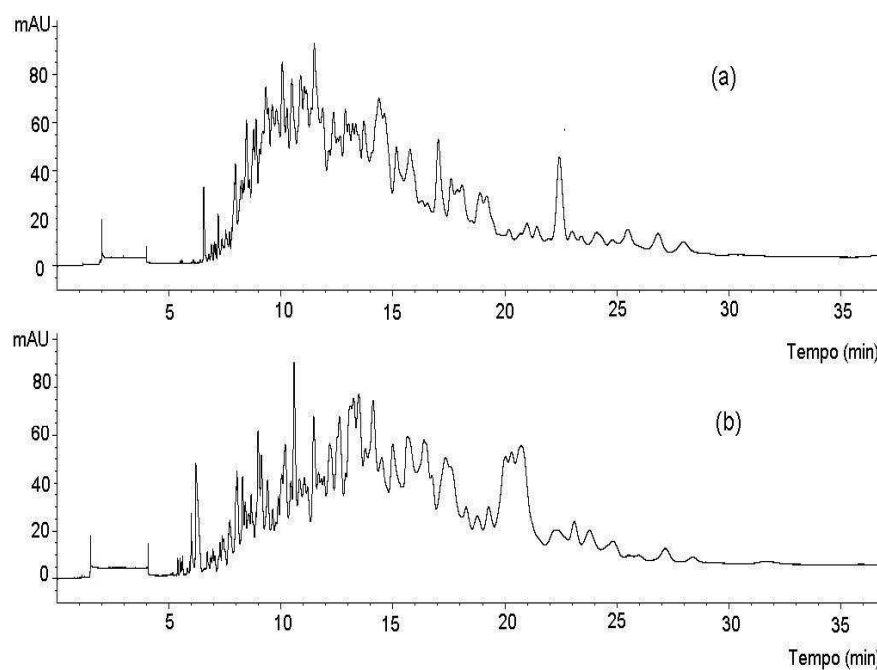


Figura 18. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno fração P2, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrintestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

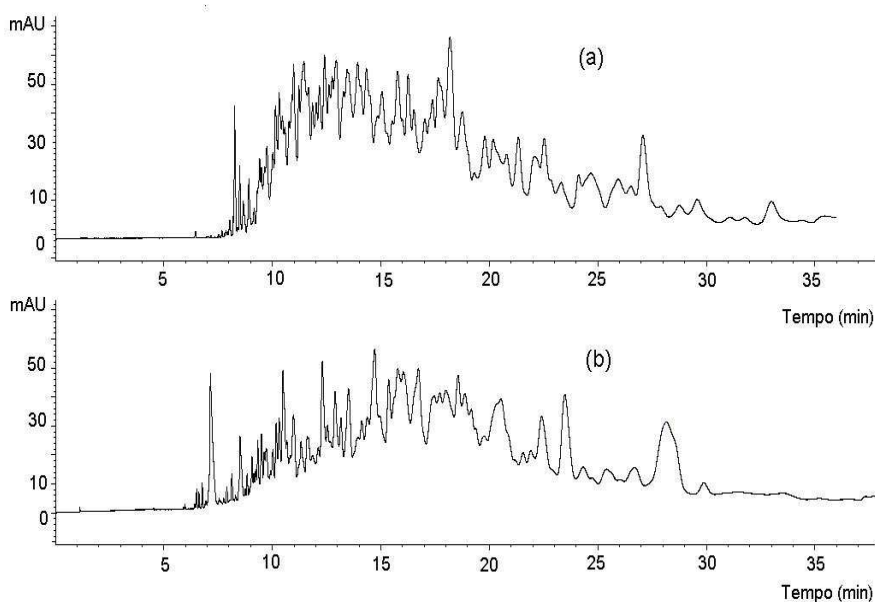


Figura 19. Eletroforegramas do colágeno hidrolisado suíno fração P3, (a) antes e (b) após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina.

3.2 Medida da atividade inibitória da ECA *in vitro*

Na Figura 20 estão apresentados os eletroforegramas da reação entre a ECA e seu substrato sintético HHL sem inibição (Figura 20a), onde se observa a formação do produto da reação, o ácido hipúrico (AH). Na reação em que houve adição de um dos hidrolisados, neste caso o WE80BG, verificou-se a redução da área do produto da reação (Figura 20b), com o aumento da concentração de hidrolisado adicionado à reação.

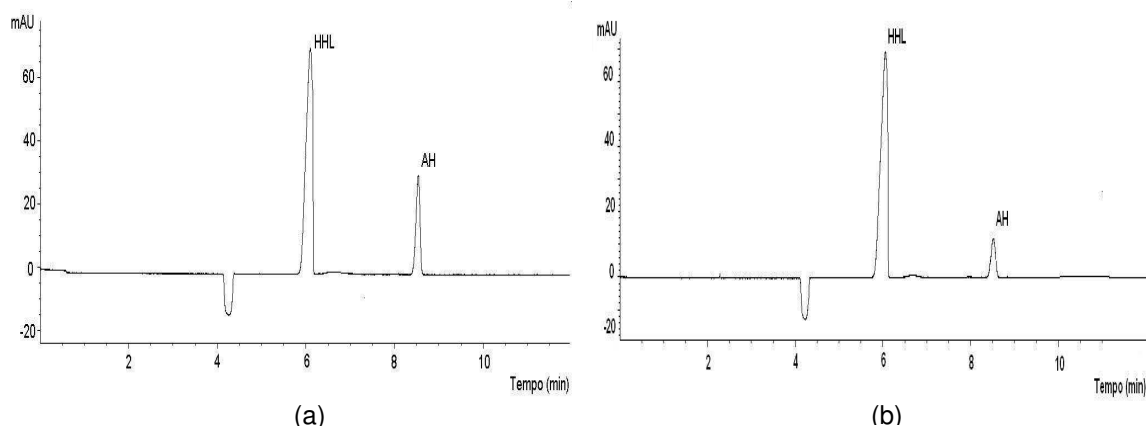


Figura 20: Eletroferograma da reação entre a ECA e HHL sem inibição (a); e com inibição parcial induzida pela adição de 0,08 mg/ml do hidrolisado WE80BG (b).

O valor IC_{50} para cada hidrolisado foi determinado por análise de regressão do logaritmo da concentração do ácido hipúrico liberado na reação (área integrada no eletroforegrama) em função da concentração de hidrolisado adicionado à reação (Figura 21).

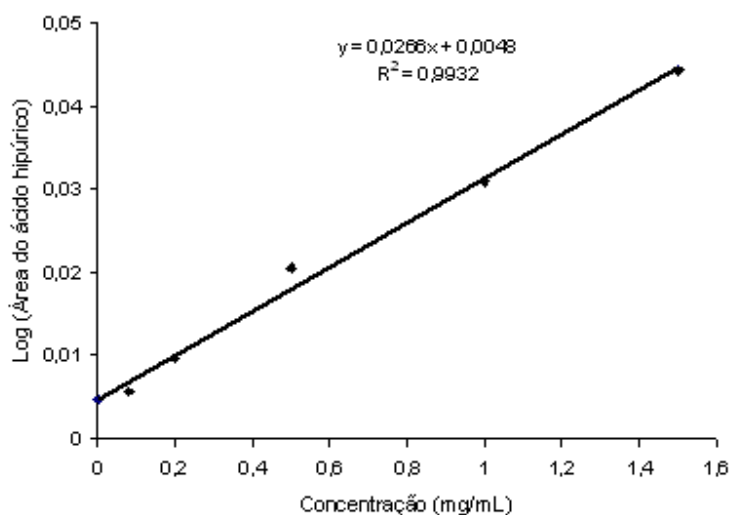


Figura 21: Determinação do valor IC_{50} pela análise de regressão do logaritmo da área do ácido hipúrico em função da concentração do hidrolisado WE80BG. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.

A capacidade dos hidrolisados comerciais de inibir a ECA, avaliada antes e após a hidrólise gastrintestinal *in vitro*, está apresentada na Figura 22. Antes da hidrólise, os hidrolisados do soro de leite, WE80BG e Hyprol 3301, e o hidrolisado da caseína CE90ACE foram os que apresentaram maior potência inibitória da ECA, com IC_{50} 0,15 mg/ml, 0,18 mg/ml e 0,20 mg/ml, respectivamente. Os demais hidrolisados analisados obtidos de três diferentes fontes protéicas, apresentaram atividade inibitória da ECA similares, com IC_{50} em torno de 0,60 mg/mL.

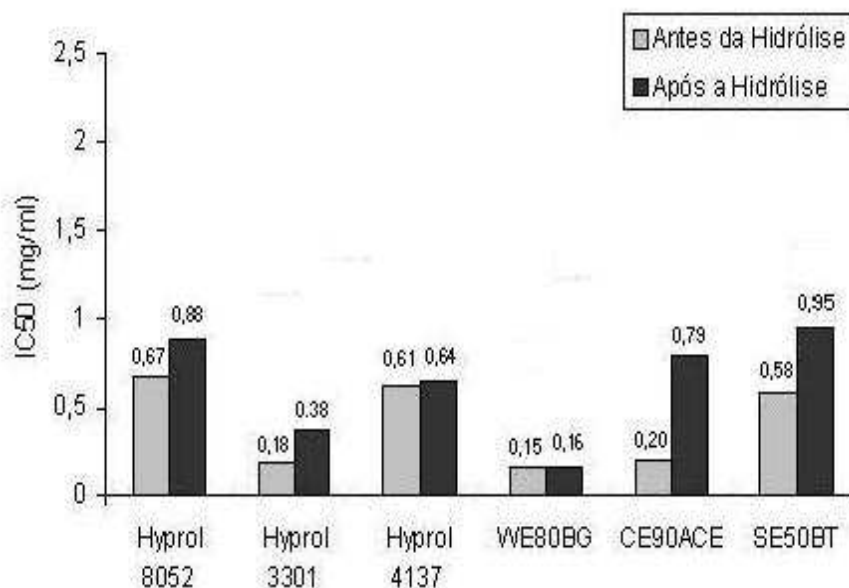


Figura 22: Valor de IC_{50} (mg proteína/mL) obtido para os hidrolisados comerciais antes e após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. Hidrolisados comerciais: Hyprol 8052 – caseína, Hyprol 3301 – soro de leite, Hyprol 4137 – glúten de trigo, CE90ACE – caseína, WE80BG – soro de leite e SE50BT – soja. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.

Pesquisadores têm reportado valores de IC_{50} semelhantes aos obtidos no presente estudo, para diferentes tipos de hidrolisados protéicos: de soro de leite IC_{50} = 0,40 mg proteína/mL (Costa et al., 2006); leite fermentado, IC_{50} = 0,14 mg proteína/mL (Hernández-Ledesma et al., 2005); feijão, IC_{50} = 0,64 mg proteína/mL (Li et al., 2005); grão-de-bico, IC_{50} = 0,18 mg proteína/mL (Yust et al., 2003); soja, IC_{50} = 0,34 mg proteína/mL (Wu e Ding, 2002) e ervilha, IC_{50} = 0,23 mg proteína/mL (Vermeirssen et al., 2003a). Alguns autores, como Wu e Ding (2002) e Hyun e Shin (2000), consideram como hidrolisados de alta atividade inibitória da ACE aqueles que apresentam IC_{50} abaixo de 0,1 mg/mL, e como inibidores de atividade moderada, os hidrolisados com valores de IC_{50} na faixa de 0,50 mg/mL.

O tratamento enzimático com pepsina e pancreatina praticamente não alterou a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do glúten de trigo (Hyprol 4137) e do soro de leite (WE80BG). Nos hidrolisados da caseína (Hyprol 8052) e soro de leite (Hyprol 3301) houve uma discreta redução na atividade inibitória da ECA após a hidrólise gastrointestinal *in vitro*. Esses resultados indicam que os peptídeos inibidores da ECA dos hidrolisados

Hyprol 4137, WE80BG, Hyprol 8052 e Hyprol 3301 possam ter sido resistentes à hidrólise gastrointestinal ou ter sido transformados pela hidrólise com pepsina e pancreatina em outros peptídeos ativos e/ou inativos.

Na Figura 23 estão apresentados a capacidade de inibir a ECA dos colágenos hidrolisados bovino e suíno, avaliada antes e após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. Todos os hidrolisados apresentaram capacidade de inibir a ECA, embora em diferentes graus. O colágeno hidrolisado bovino não fracionado (CHB) foi mais eficiente que o colágeno suíno hidrolisado não fracionado (CHS) para inibir a ECA. A ultrafiltração afetou de modo positivo, aumentando a potência inibitória, principalmente para os permeados do colágeno suíno hidrolisado, que apresentaram aproximadamente o dobro da atividade inibitória do hidrolisado original. Não houve alteração na atividade inibitória das frações P1 e P2 do hidrolisado bovino, quando comparado ao hidrolisado original não fracionado, no entanto, a fração P3 apresentou atividade inibitória mais potente entre todos os hidrolisados analisados ($IC_{50} = 5,42$ mg/mL). Kim et al. (2001) também obtiveram fração com valor IC_{50} duas vezes mais potente ao submeter o colágeno bovino hidrolisado à ultrafiltração em membrana de cut-off 1kDa.

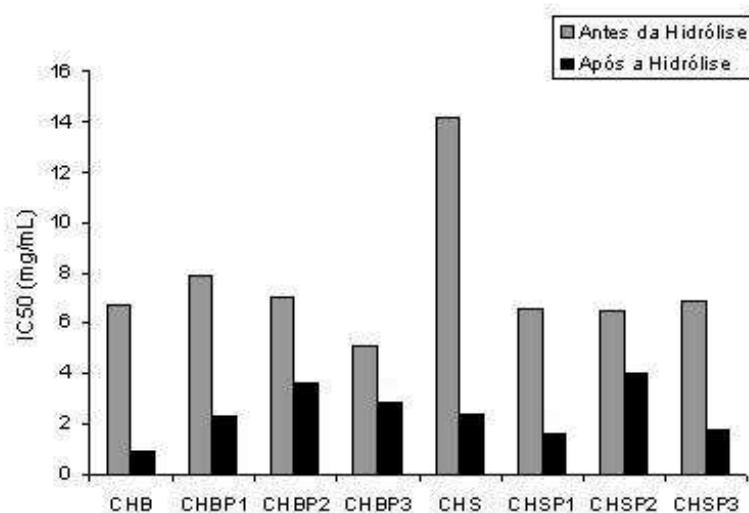


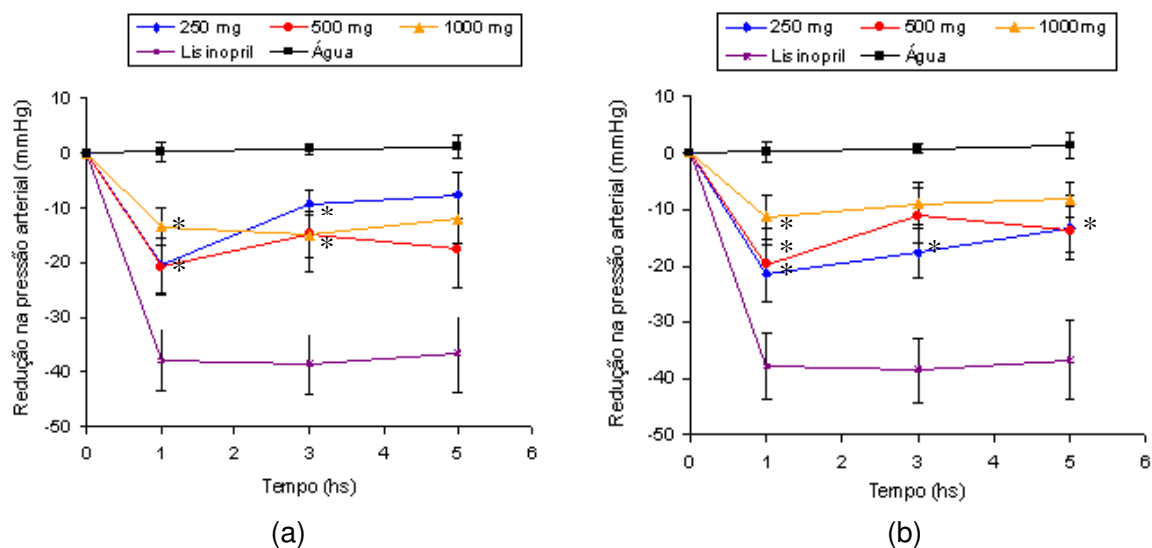
Figura 23: Valor de IC_{50} (mg proteína/mL) obtido para os hidrolisados de colágeno de origem bovina e suína antes e após a hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. Colágenos hidrolisados: CHB – bovino não fracionado; CHBP1 – bovino fração P1; CHBP2 – bovino fração P2; CHBP3 – bovino fração P3; CHS – suíno não fracionado; CHSP1 – suíno fração P1; CHSP2 – suíno fração P2; CHSP3 – suíno fração P3. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.

Valores de IC_{50} menores aos obtidos no presente estudo, foram observados por Byun e Kim (2001) em extrato de gelatina hidrolisado pela alcalase ($IC_{50} = 0,84$ mg/mL), por Saiga et al. (2003) no colágeno hidrolisado de galinha ($IC_{50} = 1,1$ mg/mL), por Fahmi et al. (2004) no colágeno hidrolisado de peixe ($IC_{50} = 0,57$ mg/mL) e por Kim et al. (2001) para o colágeno bovino hidrolisado pela alcalase ($IC_{50} = 0,92$ mg/mL).

Após a hidrólise com pepsina e pancreatina, houve aumento de mais de três vezes na atividade inibitória da ECA de todos os produtos estudados, exceto do CHBP3 e CHSP2, onde o acréscimo foi menor (Figura 23). Este efeito pode ser explicado pelo aumento da liberação de peptídeos de maior afinidade com os domínios da ECA, pelas enzimas do trato gastrointestinal.

3.3 Atividade anti-hipertensiva *in vivo*

Os resultados do efeito da administração oral dos hidrolisados comerciais na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), em comparação aos grupos controle que receberam água e a droga lisinopril estão apresentados na Figura 24.



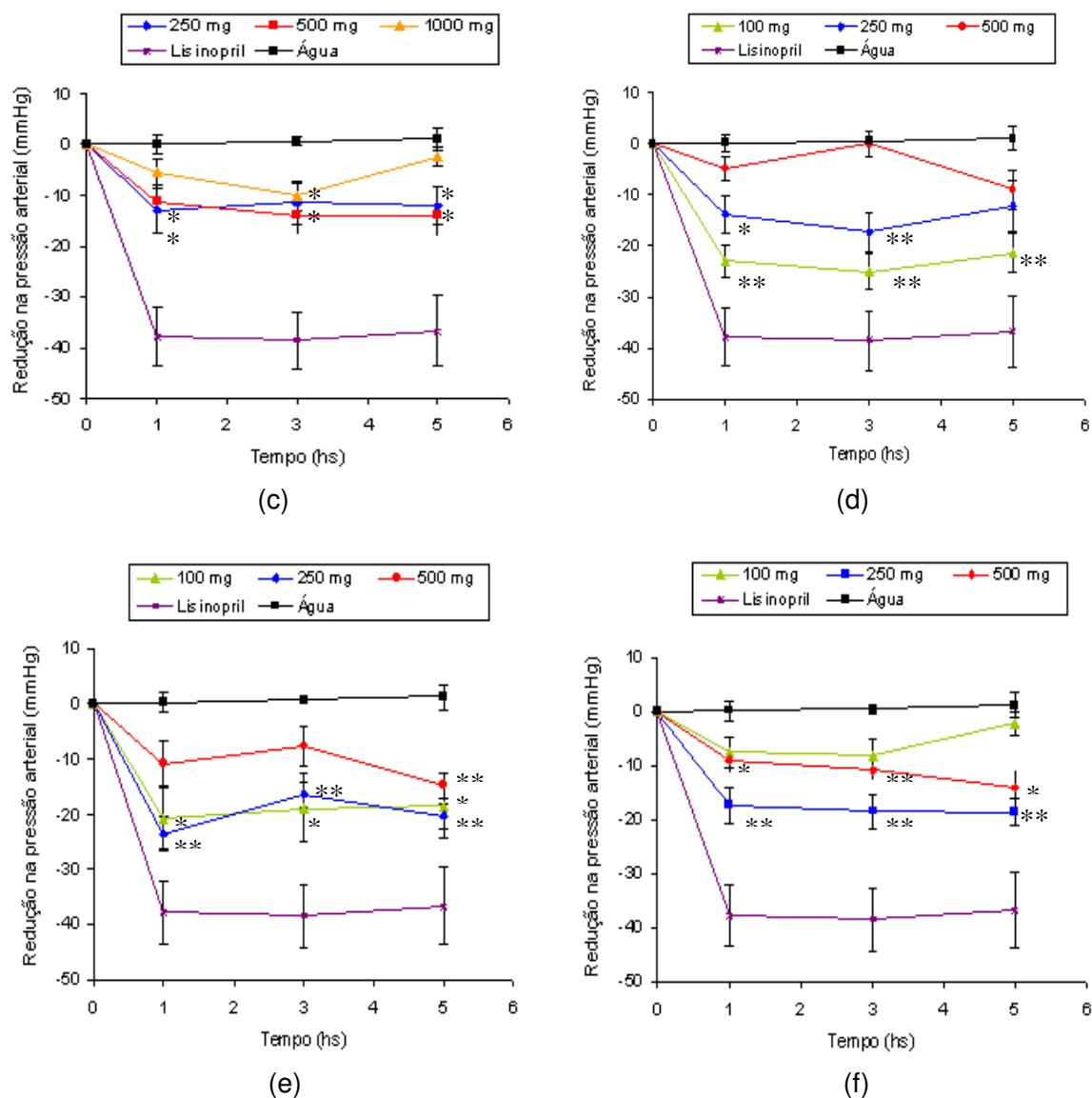


Figura 24: Comportamento da pressão arterial média de SHR após a administração oral de três diferentes doses do hidrolisado Hyprol 8052 (a), Hyprol 3301 (b), Hyprol 4137 (c), CE90ACE (d), WE80BG (e) e SE50BT (f), em comparação com os grupos controles que receberam água e lisinopril (* $p < 0,05$ vs PA basal, teste t) (** $p < 0,01$ vs PA basal, teste t). Resultados apresentados como média de 6 animais \pm erro padrão.

Para cada hidrolisado, foram testadas três diferentes doses, escolhidas com base na literatura científica pesquisada e de acordo com experimentos prévios realizados. Os hidrolisados Hyprol 8052, Hyprol 3301 e Hyprol 4137 foram administrados aos animais, por via oral, nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg de hidrolisado/kg de peso corporal. Já para os hidrolisados CE90ACE, WE80BG e SE50BT foram utilizadas doses de 100, 250 e 500 mg de hidrolisado/kg de peso corporal.

Todos os hidrolisados estudados foram capazes de promover redução estatisticamente significativa da pressão arterial dos animais. Os hidrolisados CE90ACE (caseína) e WE80BG (soro de leite) foram os mais eficientes na redução da PA dos ratos, produzindo efeito hipotensor mais intenso e prolongado (Figura 24). Estes dois hidrolisados também foram os que apresentaram os menores valores de IC_{50} , que correspondem a maior potência na inibição da ACE (Figura 22).

A administração oral (100 mg/kg de peso corporal) do hidrolisado da caseína (CE90ACE) promoveu redução significativa da pressão em relação à pressão basal do grupo, de 25 mmHg ($p= 0,0014$) após 3 horas, e de 21,33 mmHg ($p= 0,0040$) após 5 horas da ingestão. O hidrolisado do soro de leite (WE80BG) apresentou desempenho semelhante, na redução da pressão arterial dos animais. Este hidrolisado induziu redução estatisticamente significativa, de 21,33 mmHg ($p=0,0007$), 5 horas depois da administração oral. Além disso, a redução da pressão arterial induzida pelos hidrolisados CE90ACE e WE80BG foi estatisticamente igual aos resultados obtidos pelo grupo que recebeu a droga lisinopril.

De forma menos pronunciada do que os hidrolisados CE90ACE e WE80BG, o hidrolisado do soro de leite (Hyprol 3301) reduziu a pressão arterial dos animais de 176,33 mmHg para 155 mmHg, após 1 hora, e para 158,50 mmHg, após 3 horas.

Esses resultados estão de acordo com a literatura, que destaca o potencial das proteínas do leite como fontes precursoras de peptídeos inibidores da ECA. Segundo Meisel (1998), a composição dos peptídeos que se formam durante a digestão das proteínas do leite no trato gastrointestinal pode ser um dos fatores que explicam os melhores efeitos anti-hipertensivos exercidos por hidrolisados do soro de leite e da caseína, em relação a hidrolisados obtidos de outras fontes protéicas.

Do ponto de vista da composição aminoacídica, a caseína é uma proteína de caráter hidrofóbico, contendo elevada concentração de prolina. Já as proteínas do soro apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (Sgarbieri, 2004; Sgarbieri, 1996). De acordo com Wu e Ding (2002), os inibidores preferenciais da ACE são aqueles peptídeos que contêm aminoácidos dicarboxílicos na posição N-terminal além de resíduos de aminoácidos com cadeia

ramificada, como valina e isoleucina. Segundo Pihlanto-Leppälä et al. (2000), também é desejável que no lado C-terminal dos peptídeos estejam presentes os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos - triptofano, tirosina, fenilalanina e prolina.

O hidrolisado da soja (SE50BT) também apresentou moderada atividade anti-hipertensiva em SHR, promovendo redução significativa da pressão de 18,55 mmHg após 3 horas, permanecendo neste valor 5 horas após a administração oral. Já o hidrolisado Hyprol 8052 foi capaz de reduzir significativamente a pressão arterial por até 3 horas após a administração oral (250 mg/kg de peso corporal), de 179,5 mmHg para 159 e 170 mmHg, respectivamente. Após 3 horas, a pressão arterial dos animais mostrou tendência à elevação, sendo que 5 horas após a administração, a diferença da PA não foi significativa, quando comparada à pressão basal do grupo.

O hidrolisado do glúten de trigo (Hyprol 4137) foi o que apresentou pior desempenho *in vivo*, induzindo a menor redução, embora ainda significativa, na pressão arterial dos SHR.

Resultados similares utilizando hidrolisados protéicos comerciais foram obtidos por Murakami et al. (2004), a exemplo dos hidrolisados de caseína (CE90STL e CE90GMM) que promoveram um decréscimo significativo da pressão de 20,7 e 18 mmHg, respectivamente, após 6 horas de administração oral; hidrolisados do soro de leite (WE80BG e WE80M) que reduziram significativamente a pressão dos ratos em 21,2 e 18,8 mmHg, respectivamente; e o hidrolisado do glúten de trigo (WGE80GPN) que induziu uma redução de 17 mmHg, após 6 horas de administração oral nos animais.

De modo geral, a redução na pressão arterial dos SHR foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do hidrolisado. Para os hidrolisados CE90ACE e WE80BG, que apresentaram melhor atividade anti-hipertensiva *in vitro* e *in vivo*, as menores doses foram as mais efetivas na redução da pressão arterial (100 e 250 mg/kg de peso corporal, respectivamente). Esses resultados são opostos aos obtidos por Kapel et al. (2005) que verificaram após a administração de 100, 300 e 500 mg/kg de peso corporal do hidrolisado de alfafa, uma redução da pressão arterial diretamente proporcional ao aumento da dose. Wu e Ding (2001) também observaram comportamento dose-dependente de redução da pressão arterial de SHR, após a administração de três

diferentes doses (100, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal) do hidrolisado de soja, sendo que a concentração de 1000 mg/kg de peso corporal foi a que induziu o maior efeito hipotensor.

A explicação para os diferentes resultados em relação a dose-resposta pode ser encontrada no estudo da farmacocinética. Modelos farmacodinâmicos e farmacocinéticos são geralmente aplicados com o objetivo de selecionar a melhor dose e intervalos de aplicação de diversos tipos de substâncias. Entretanto, estudos clínicos com agentes anti-hipertensivos demonstram que essa não é uma tarefa fácil. Variações circadianas, efeito placebo, assim como variabilidade nas respostas dos grupos estudados contribuem para aumentar a complexidade dos modelos farmodinâmicos (Zannad, 1995).

Sob estes aspectos, a duração do bloqueio do sistema renina angiotensina pelos inibidores da ECA pode parecer a primeira vista o parâmetro ideal para estudos farmacodinâmicos. Porém, algumas pesquisas mostram que a atividade da ECA no plasma não está correlacionada com a queda da pressão arterial, sugerindo dessa forma que podem existir outros mecanismos envolvidos na redução da pressão arterial pelos agentes anti-hipertensivos (Zannad, 1995).

Para os colágenos hidrolisados, a curva dose-resposta foi realizada apenas para os hidrolisados CHB e CHSP1 e os resultados estão apresentados na Figura 25. A dose de 500 mg/kg de peso corporal foi a mais efetiva tanto para o colágeno hidrolisado bovino quanto para o colágeno hidrolisado suíno na redução da pressão arterial dos SHR e, por esse motivo, foi utilizada para os todos os produtos na avaliação da atividade anti-hipertensiva *in vivo*.

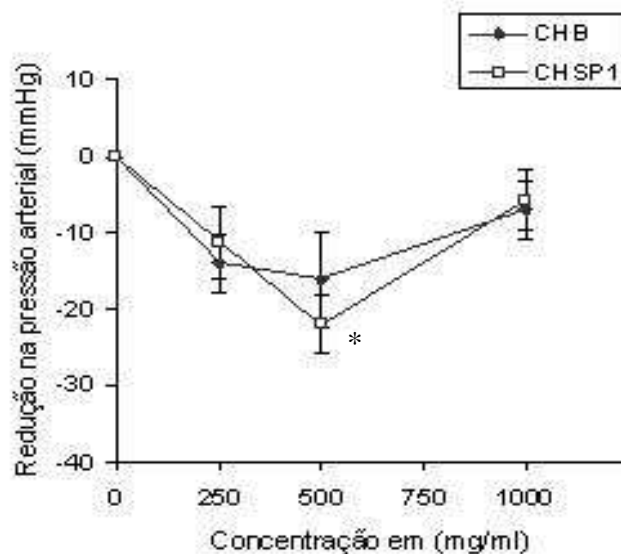


Figura 25: Curva dose-resposta da redução da PA em ratos espontaneamente hipertensos para os hidrolisados CHB e CHSP1, após 3 horas da administração oral (* $p < 0,05$ vs PA basal, teste t). Resultados apresentados como média de 6 animais \pm erro padrão.

Na Figura 26 estão apresentados os resultados do efeito da administração oral do colágeno hidrolisado bovino e suíno e de suas frações na pressão arterial de SHR. O colágeno hidrolisado bovino (CHB) não reduziu significativamente ($p > 0,05$) a pressão arterial dos animais ao longo do período experimental; já as suas frações apresentaram capacidade de induzir redução significativa na pressão arterial. A fração P1 (CHBP1) foi a mais eficiente, reduzindo a pressão em 21,16 mmHg, 5 horas após a administração oral ($p = 0,027$) e a fração P3 (CHBP3), de menor peso molecular, foi a de menor eficiência na redução da pressão arterial dos animais.

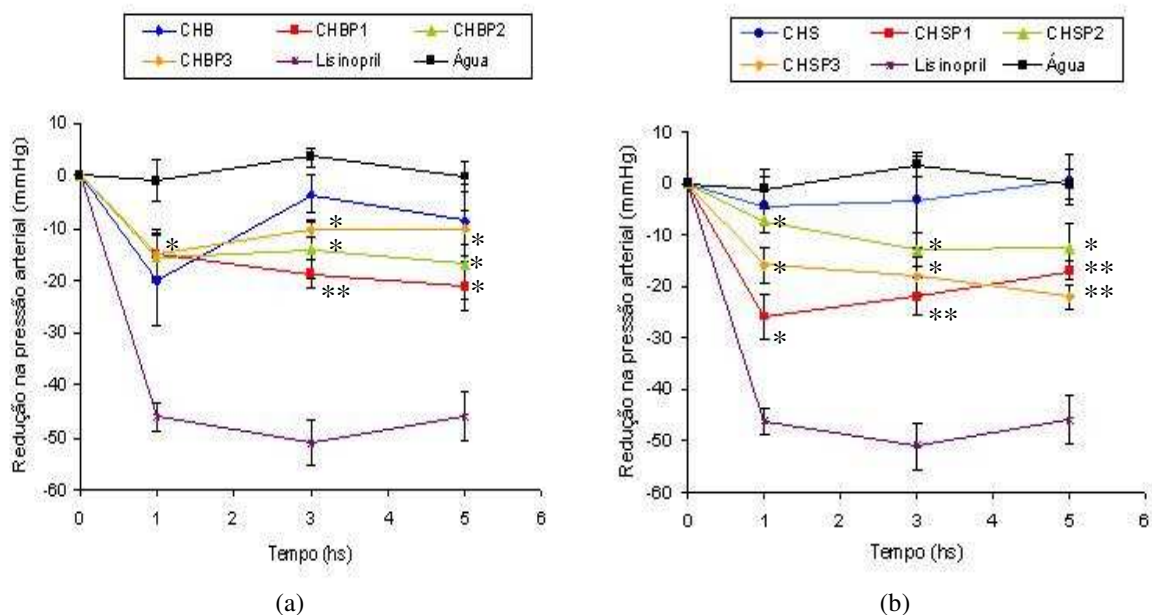


Figura 26. Efeito da administração oral (500 mg/kg de peso corporal) dos hidrolisados de colágeno bovino (a) e suíno (b) e de suas frações na pressão arterial de SHR, em comparação com os grupos controles que receberam água e lisinopril (* $p < 0,05$ vs PA basal, teste t) (** $p < 0,01$ vs PA basal, teste t). Colágenos hidrolisados: CHB – bovino não fracionado; CHBP1 – bovino fração P1; CHBP2 – bovino fração P2; CHBP3 – bovino fração P3; CHS – suíno não fracionado; CHSP1 – suíno fração P1; CHSP2 – suíno fração P2; CHSP3 – suíno fração P3. Resultados apresentados como média de 6 animais \pm erro padrão.

O hidrolisado de colágeno suíno não fracionado não alterou a pressão arterial dos animais, estando em consonância com o resultado de inibição da ECA *in vitro* realizado antes da hidrólise pelas enzimas gastrintestinais, que o indicou como o hidrolisado de menor potência inibitória. As frações obtidas por ultrafiltração foram capazes de promover alterações significativas na pressão arterial dos animais (Figura 26), o que também foi observado *in vitro*.

Assim como foi observado para o CHBP1, o CHSP1 também promoveu a máxima redução na pressão arterial dos animais, de $193,7 \pm 3,8$ mmHg para $167,8 \pm 7,9$ mmHg ($p = 0,02$) 1 hora após da administração oral. A pressão arterial do grupo após 5 horas foi $176,6 \pm 2,9$ mmHg ($p = 0,0002$), resultado ainda significativamente mais baixo que a pressão basal dos animais.

Dentre os hidrolisados analisados *in vivo*, o CHSP3 induziu efeito mais prolongado na redução da pressão arterial dos ratos 5 horas após a administração oral, $22,0 \pm 3,4$ mmHg da pressão basal do grupo ($p = 0,002$).

Em todos os experimentos, a droga lisinopril induziu nos animais um forte efeito hipotensor, cerca de 40 mmHg, inferior ao reportado por Suetsuna (1998) para o efeito de captopril, 50 mmHg. O grupo controle, que recebeu água, não apresentou alterações significativas na pressão arterial durante o período experimental.

Resultados mais expressivos sobre a atividade anti-hipertensiva da gelatina e derivados *in vivo* foram encontrados por Saiga et al. (2003). Nesse estudo, a administração oral de 1g/kg de peso corporal do colágeno de galinha não tratado e tratado com protease bacteriana (*Aspergillus*) foi capaz de promover forte efeito hipotensor *in vivo*, induzindo redução significativa de 50 e 40 mmHg, respectivamente, na pressão arterial de SHR.

Todas as frações dos colágenos hidrolisados bovino e suíno, obtidas por ultrafiltração, apresentaram maior atividade anti-hipertensiva *in vivo* do que os hidrolisados não fracionados. Segundo Pihlanto-Leppälä (2001), a maioria dos peptídeos com atividade inibitória da ECA apresenta baixo peso molecular, geralmente até 12 resíduos de aminoácidos. A partir desta observação, a ultrafiltração com membranas tem sido aplicada como um método para concentrar peptídeos com atividade anti-hipertensiva, como observado por Fujita et al. (1995). Estes autores após a ultrafiltração do extrato “Katsuobushi” (pescado desidratado) em membrana de 3kDa, obtiveram um permeado com o dobro da atividade anti-hipertensiva em SHR, quando comparado ao hidrolisado integral.

Ao comparar os resultados obtidos *in vivo* com os valores de IC_{50} antes e após a hidrólise gastrointestinal, observou-se que não houve concordância entre a eficiência em inibir a ECA *in vitro* e a redução da pressão arterial *in vivo* dos hidrolisados protéicos (Figuras 27 e 28), exceto para o colágeno hidrolisado suíno (CHS) antes da hidrólise gastrointestinal (Figura 28).

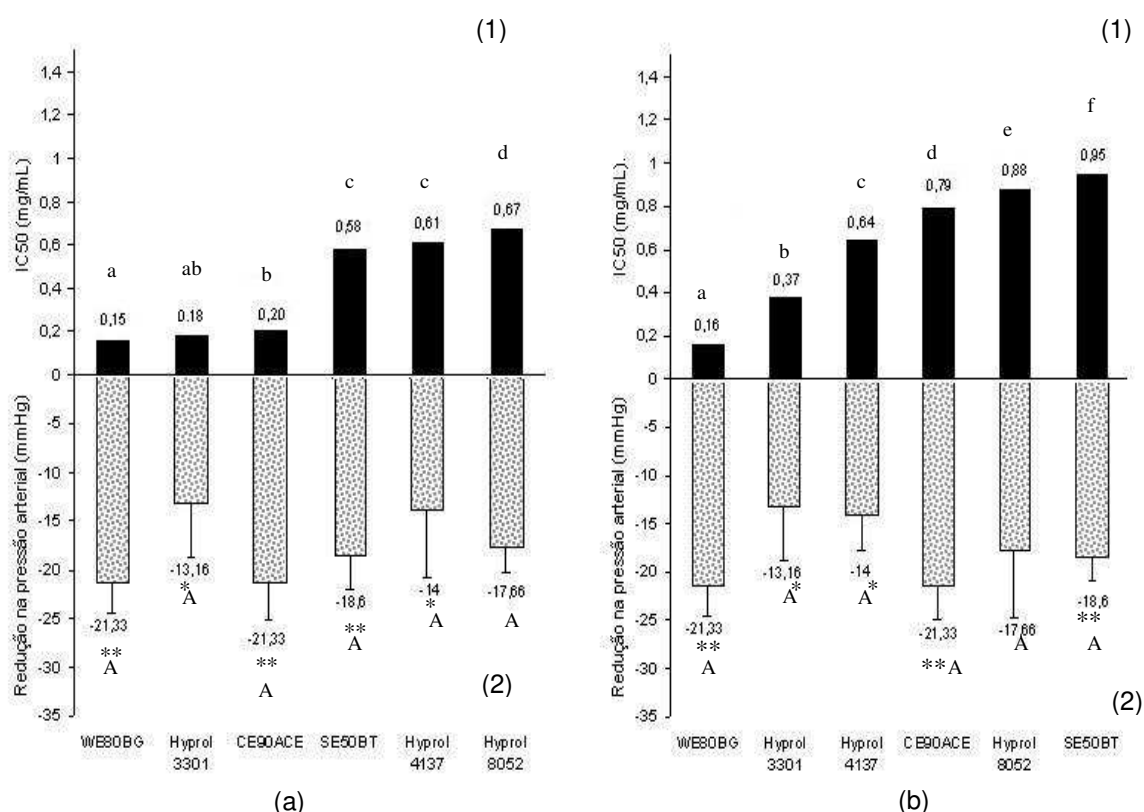


Figura 27: Comparação entre os resultados *in vitro* x *in vivo*. (1) Valores de IC₅₀ (mg proteína/mL) obtidos para os hidrolisados comerciais antes (a) e depois (b) da hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. (2) Mudanças na pressão arterial de ratos SHR após 5 horas da administração oral dos hidrolisados (* $p < 0,05$ vs PA basal, teste *t*) (** $p < 0,01$ vs PA basal, teste *t*). Letras iguais indicam mesmo nível de significância e letras diferentes indicam diferença estatística $p < 0,05$ (teste Tukey). Ver materiais e métodos para codificação das amostras.

Todos os hidrolisados protéicos comerciais promoveram igual efeito anti-hipertensivo *in vivo* ($p > 0,05$), porém apresentaram diferentes capacidades de inibição da ECA *in vitro*, evidenciada por diferentes valores de IC₅₀. O hidrolisado do glúten de trigo (Hyprol 4137) promoveu redução na pressão arterial semelhante ao hidrolisado do soro de leite (Hyprol 3301), entretanto apresentou capacidade inibitória da ECA aproximadamente três vezes maior que o hidrolisado Hyprol 3301 (Figura 27a).

A hidrólise gastrointestinal *in vitro* piorou a capacidade de inibição da ECA dos hidrolisados CE90ACE e SE50BT, que acabaram apresentando os mais altos valores de IC₅₀. Contudo, esses hidrolisados induziram forte efeito hipotensor, similar ao efeito apresentado pelo hidrolisado WE80BG com valor IC₅₀ = 0,16 mg proteína/mL (Figura 27b).

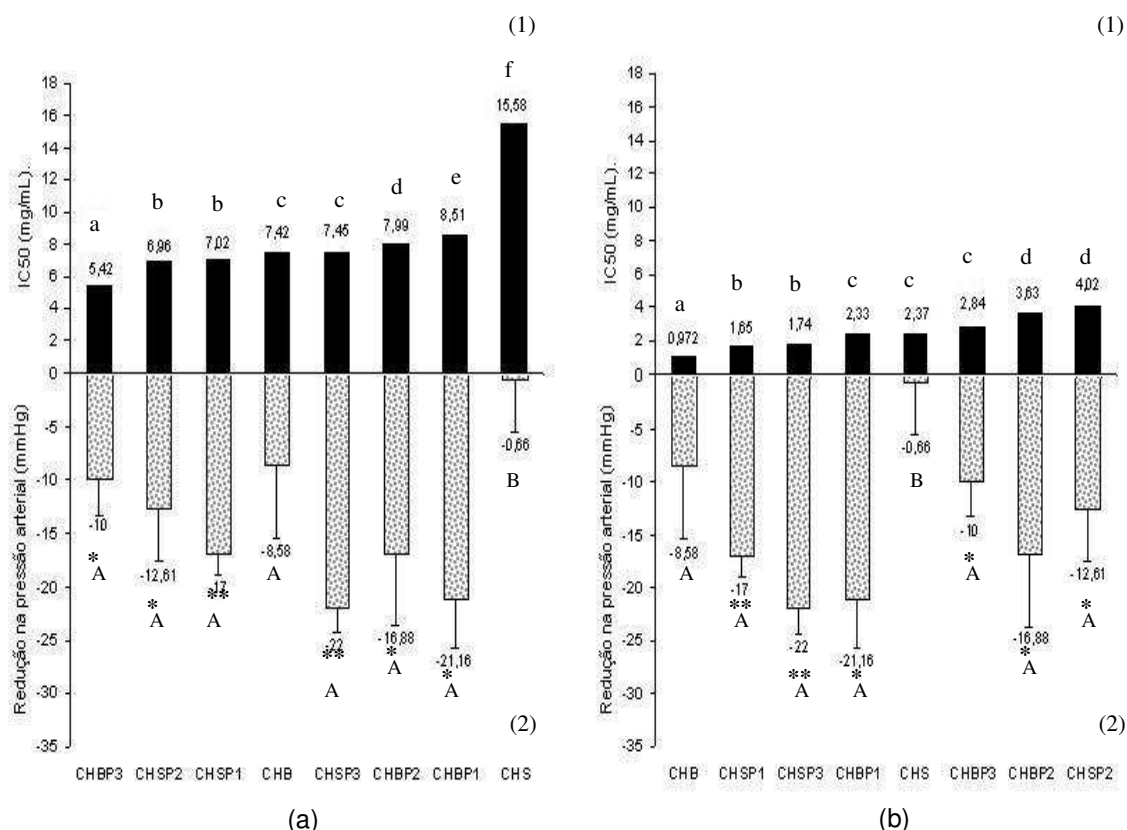


Figura 28: Comparação entre os resultados *in vitro* x *in vivo*. (1) Valores de IC₅₀ (mg proteína/mL) obtidos para os colágenos hidrolisados bovino e suíno antes (a) e depois (b) da hidrólise gastrointestinal *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. (2) Mudanças na pressão arterial de ratos SHR após 5 horas da administração oral dos hidrolisados (* $p < 0,05$ vs PA basal, teste *t*) (** $p < 0,01$ vs PA basal, teste *t*). Letras iguais indicam mesmo nível de significância e letras diferentes indicam diferença estatística $p < 0,05$ (teste Tukey). Ver materiais e métodos para codificação das amostras.

O colágeno hidrolisado suíno não fracionado (CHS) foi o único produto em que foi observada correlação dos resultados *in vitro* e *in vivo*, apresentando a menor atividade inibitória da ECA e o menor efeito hipotensor *in vivo* dentre os hidrolisados analisados antes do tratamento enzimático. Por outro lado, o CHBP3 que apresentou o menor valor IC₅₀, ou seja, a maior atividade inibitória da ECA *in vitro*, não foi capaz de promover forte redução na pressão arterial de ratos SHR. Observou-se também que os hidrolisados CHSP3 e CHBP1 que apresentaram valores maiores de IC₅₀, foram os produtos que produziram maior efeito hipotensor *in vivo* (Figura 28a).

Após a hidrólise *in vitro*, o hidrolisado de colágeno bovino não fracionado apresentou maior atividade inibitória da ECA entre os hidrolisados analisados, aproximadamente duas vezes mais que o CHBP1, resultados opostos aos obtidos por

avaliação da atividade *in vivo*. Adicionalmente, não houve diferença entre os valores de IC₅₀ para os hidrolisados CHBP1 e CHS, porém o CHS não foi capaz de produzir redução significativa da PA dos SHR, enquanto que o CHBP1 foi um dos produtos mais eficientes na redução na pressão arterial dos animais (Figura 28b).

As diferenças entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, podem ter ocorrido devido à clivagem proteolítica adicional dos hidrolisados durante e após a absorção intestinal. Segundo Vermeissen, Camp e Verstraete (2004), há inúmeras barreiras no corpo humano, tais como a absorção intestinal e a degradação pelas peptidases séricas, que podem ativar ou inativar os peptídeos bioativos antes de sua ligação ao sítio da ECA.

A dificuldade na absorção dos peptídeos ativos de hidrolisados de elevado tamanho molecular pode ser um dos fatores que influenciaram no fraco efeito hipotensor *in vivo*, observado para os colágenos hidrolisado bovino e suíno não fracionado. Segundo Clemente (2000), a absorção de hidrolisados protéicos na forma de dipeptídeos e tripeptídeos é mais rápida e eficaz quando comparada à proteína intacta ou a aminoácidos livres, principalmente em situações de estresse, redução da área de absorção intestinal ou comprometimento das funções digestivas.

De acordo com Vermeirssen et al. (2003b), a simulação do tratamento gastrointestinal promoveria a formação de peptídeos anti-hipertensivos que seriam resistentes ao ataque enzimático posterior. Assim como foi observado para os hidrolisados comerciais de baixo peso molecular, os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o efeito pode ser variável, em alguns casos melhorando a atividade dos hidrolisados, e reduzindo em outros. Predizer o efeito dessas enzimas em hidrolisados contendo peptídeos de tamanho e seqüências variadas é praticamente impossível, sendo o experimento *in vivo* um método mais confiável para avaliar a atividade biológica desses hidrolisados.

Na literatura científica pesquisada, somente foram encontrados resultados da avaliação da resistência de hidrolisados às enzimas do trato gastrointestinal em experimentos *in vitro*, sem a confirmação do efeito *in vivo* (Gómez Ruiz, Ramos e Recio, 2004; Hernández-Ledesma et al., 2004; Vermeirssen et al., 2003; Wu e Ding, 2002). Porém os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que a aplicação da digestão

gastrointestinal *in vitro* unicamente não é capaz de predizer sobre a atividade biológica dos hidrolisados. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos com o decréscimo da pressão arterial produzido pela ação dos peptídeos, o que levaria também a uma não correlação dos resultados *in vitro* e *in vivo*.

3.3.1 Experimento Crônico

Dentre os produtos analisados, o hidrolisado do soro de leite (WE80BG) e a fração P1 do colágeno bovino (CHBP1), por terem induzido forte efeito hipotensor *in vivo* após 5 horas da administração oral, foram escolhidos para o experimento crônico.

Para avaliar o efeito a longo prazo da administração oral dos hidrolisados WE80BG e CHBP1, utilizou-se as concentrações de 250 e 500 mg/kg de peso corporal, respectivamente, que de acordo com os testes anteriores foram as doses mais efetivas na redução da pressão arterial dos animais.

Na Figura 29 estão apresentados os resultados do efeito da administração oral crônica dos hidrolisados WE80BG e CHBP1. A administração oral do hidrolisado do soro de leite (WE80BG) promoveu uma redução progressiva da pressão arterial dos SHR, comparada à pressão basal deste grupo. Na primeira semana de administração do hidrolisado, a redução na pressão arterial foi discreta, porém estatisticamente mais baixa que a do grupo controle. Após 2 semanas de tratamento, um forte efeito hipotensor foi observado, com uma redução significativa de 20,60 mmHg da pressão arterial, redução esta que praticamente foi mantida até o final do período experimental (Figura 29a).

De forma menos pronunciada do que o hidrolisado WE80BG, o hidrolisado CHBP1 também foi capaz de induzir redução significativa da pressão arterial dos animais. No início do experimento, a média da pressão arterial dos dois grupos, controle (que recebeu água) e experimental (que recebeu CHBP1) foi similar. O efeito significativo na redução da pressão arterial foi observado no 11º e 18º dias do início do tratamento ($p < 0,05$), embora não tenha sido observada diferença estatística nas duas últimas semanas de tratamento, quando comparado aos valores basais. No entanto, ao final do experimento, a pressão arterial do grupo experimental foi estatisticamente mais baixa que a do grupo controle ($p = 0,03$) (Figura 29b).

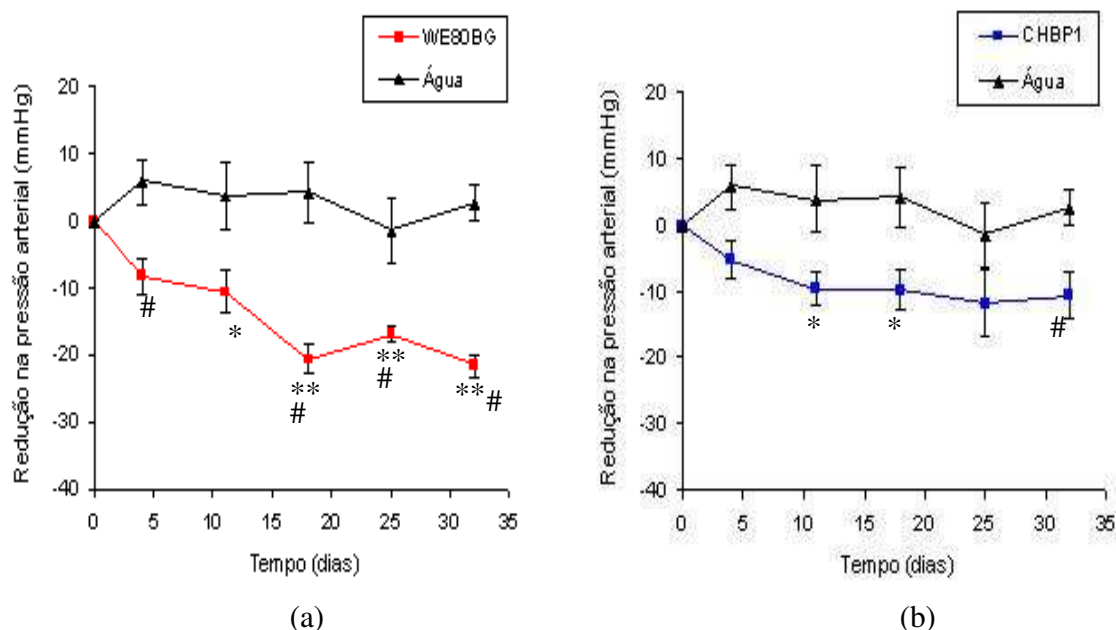


Figura 29: Comportamento da pressão arterial média de ratos SHR após a administração oral crônica do hidrolisado WE80BG (a) e CHBP1 (b), em comparação com o grupo controle que recebeu água. (* $p < 0,05$ vs PA basal, teste t) (** $p < 0,001$ vs PA basal, teste t) (# $p < 0,05$ vs grupo controle, teste t).. Resultados apresentados como média de 5 animais \pm erro padrão.

Fahmi et al. (2004) pesquisaram o efeito da administração crônica do hidrolisado de colágeno de peixe. Após um mês de administração oral diária de 300 mg/kg de peso corporal de hidrolisado, os autores observaram um decréscimo significativo da pressão arterial de SHR (≈ 40 mmHg), superior ao encontrado para o hidrolisado de colágeno bovino (CHBP1).

Em estudo de administração crônica de leite fermentado, Sipola et al. (2002) só detectaram o efeito na pressão arterial de SHR após 6 semanas de tratamento, enquanto que Fujita, Yamagami e Ohshima (2001), observaram redução significativa da pressão arterial de humanos, com 4 semanas de administração de hidrolisado de pescado submetido à ultrafiltração por membrana de cut-off 3kDa.

No estudo apresentado por Wu e Ding (2001), a administração oral diária de 100 mg/kg de peptídeos derivados da proteína de soja induziu um decréscimo significativo na pressão arterial de SHR (38 mmHg), após um mês de tratamento. Em outro estudo de administração crônica, Yoshii et al. (2001) avaliaram o efeito da administração oral diária

de 500 mg/kg de peso corporal de oligopeptídeos da gema do ovo de galinha, na pressão arterial de SHR. Após 12 semanas de administração, esses autores observaram que a pressão arterial sistólica e diastólica dos ratos tratados foi aproximadamente 10% menor que a dos ratos do grupo controle, que receberam água.

Vale ressaltar que para a realização do experimento crônico com os hidrolisados WE80BG e CHBP1 foram utilizados SHR com 28-32 semanas de vida. Segundo Marczak et al. (2003), o efeito hipotensor de peptídeos inibidores da ACE em SHR velhos (com idade > 28 semanas) é menor do que em ratos jovens (com idade < 20 semanas), sugerindo que o efeito anti-hipertensivo promovido pela administração crônica desses hidrolisados possa ser maior do que os resultados apresentados nesse trabalho.

4. CONCLUSÕES

A hidrólise gastrintestinal *in vitro* promoveu efeito variável sobre a atividade inibitória da Enzima Conversora de Angiotensina dos hidrolisados protéicos comerciais. Os hidrolisados de maior peso molecular, colágenos hidrolisados bovino e suíno, apresentaram aumento significativo da potencia inibitória da ECA. Por outro lado, observou-se redução na capacidade de inibir a ECA dos hidrolisados com menor peso molecular como os hidrolisados da caseína (Hyprol 8052 e CE90ACE), soro de leite (Hyprol 3301) e soja (SE50BT).

Ao comparar os resultados obtidos *in vivo* com os valores de IC_{50} antes e após a hidrólise gastrintestinal, observou-se que não houve concordância entre a eficiência em inibir a ECA *in vitro* e a redução da pressão arterial *in vivo* dos hidrolisados.

Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que as enzimas gastrintestinais exercem grande influência sobre atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados protéicos comerciais, podendo aumentar ou diminuir o efeito hipotensor *in vivo*. Contudo, predizer o efeito dessas enzimas em hidrolisados contendo peptídeos de tamanho e seqüências variadas é praticamente impossível, sendo o experimento *in vivo* um método mais confiável para avaliar a atividade biológica desses hidrolisados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL METHODS ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.

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

CHEN, C. S. Relationship between water activity and freezing point depression of food systems. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p. 433-435, 1987.

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

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, *in press*, 2006.

COSTA, E. L., NETTO, F. M., NUNES DA SILVA, V. S. Determination of angiotensin-converting enzyme activity (ACE) by capillary electrophoresis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, p.42, Suppl., 2003.

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

FAHMI, A.; MORIMURA, S.; GUO, H. C.; SHIGEMATSU, T.; KIDA, K.; UEMURA, Y. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1195-1200, 2004.

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

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

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

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v.14, n.2, p.1075-1080, 2004.

GRIMBLE, G. K.; REES, R. G. KEOHANE, P. P. CARTWRIGHT, T.; DESREUMAUX, M.; SILK, D. B. Effect of peptide chain lenght on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. **Gastroenterology**, v.92, n.1, p. 136-142, 1987.

HENRIQUES, G. S.; ROSADO, G. P. Formulação de dietas enterais artesanais e determinação da osmolalidade pelo método crioscópico. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 12, n.3, p. 225-232, 1999.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; RECIO, I. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. **International Dairy Journal**, v.14, n.10, p.889-898, 2004.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MIRALLES, B. ; AMIGO, L.; RAMOS, M.; RECIO, I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, n. 6, p. 1041-1048, 2005.

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

JANINI, G. M.; METRAL, C. J.; ISSAQ, H. J.; MUSCHIK, G. M. Peptide mobility and peptide mapping in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.848, n. 1-2, p.417-433, 1999.

JUNG, W. K.; MENDIS, E.; JE, J. Y.; PARK, P. J.; SON, B. W.; KIM, H. C.; CHOI, Y. K.; KIM, S. K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v.94, n.1, p. 26-32, 2006.

KAPEL, R.; CHABEAU, A.; LESAGE, J.; RIVIERE, G.; RAVALLEC-PLE, R.; LECOUTURIER, D.; WARTELLE, M.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P. Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfafa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.120-126, 2006.

KIM, S. K.; BYUN, H. G.; PARK, P. J.; SHAHIDI, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skim gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n.6, p.2992–2997, 2001.

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 Science Technology International**, v.11, n.4, p. 281-287, 2005.

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

MARCZAK, E. D.; USUI, H.; FUJITA, H.; YANG, Y.; YOKKO, M.; LIPKOWSKI, A. W.; YOSHIKAWA, M. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. **Peptides**, v.24, n.6, p.791-798, 2003.

MATTHEWS, D. M.; PAYNE, J. W. Transmembrane transport of small peptides. **Current Topics os Membrane Transport**, v.14, n.1, p. 331-425, 1980.

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

MURAKAMI, M.; TONOUCHI, H.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; NEGISHI, H.; SAITO, T. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated

from a commercial whey product. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p.1967-1974, 2004.

PACHECO, M. T. B.; AMAYA-FARFAN, J.; SGARBIERI, V. C. Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v.26, p.327-338, 2002.

PANYAM, D. ; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.4, p.120-125, 1996.

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

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; KOSKINEN, P.; PIILOLA, K.; TUPASELA, T.; KORHONEN H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. **Journal of Dairy Research**, v.67, n.1, p.53-64, 2000

RODRIGUEZ, I.; LI, S. F. Y. Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.383, n.1-2, p. 1-26, 1999.

SAIGA, A.; OKUMURA, T.; MAKIHARA, T.; KATSUTA, S.; SHIMIZU, T.; YAMADA, R.; NISHIMURA, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.6, p.1741-1745, 2003.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 a 100 Kda. **Analytical Biochemistry**, v.166, p. 368-379, 1987.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 17, n.4, p. 397-409, 2004.

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

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

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

SLOAN, A. E. The top ten functional food trends. **Food Technology**, v.54, n.4, p.33-62, 2000.

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

SUETSUNA, K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.9, p. 415-419, 1998.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, n.20, v.5, p. 493-511, 1997

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

VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; DECROOS, K.; VAN WIJMELEBEKE, L.; VERSTRAETE, W. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.2, p.429-438, 2003.

VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v.92, n.3, p.357-366, 2004.

VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; DEVOS, L.; VERSTRAETE, W. Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.19, p. 5680-5687, 2003b.

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

WU, J.; DING, X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.1, p.501-506, 2001.

YAMAMOTO, N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. **Biopolymers**, v. 43, n.1, p. 129-134, 1997.

YANG, Y.; MARCZAK, E. D.; USUI, H.; KAWAMURA, Y.; YOSHIKAWA, M. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.8, p.2223–2225, 2004

YOSHII, H.; TACHI, N.; OHBA, R.; SAKAMURA, O.; TAKEYAMA, H.; ITANI, T. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken eggs yolks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.128, n.1, p. 27-33, 2001.

YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, v.81, n. 3, p.363-369, 2003.

ZANNAD, F. Duration of action of angiotensin converting enzyme inhibitors. **American Journal of Hypertension**, v.8, n.10, p. 75S – 81S, 1995.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS COMERCIAIS NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

RESUMO

Os rins estão diretamente relacionados com o controle da hipertensão arterial sistêmica por secretarem a angiotensina II, que é o substrato sintético da ECA, além do controle da reabsorção ou secreção de NaCl. A maioria das ações conhecidas da angiotensina II é mediada pela ativação de receptores do tipo AT, incluindo vasoconstrição, antinatriurese, secreção de aldosterona, ativação simpática, inibição da síntese de renina e crescimento e proliferação celular. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de hidrolisados protéicos comerciais na função renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Para este estudo, foram escolhidos o hidrolisado de caseína (CE90ACE) e as frações P1 (PM < 30-50kDa) do colágeno hidrolisado bovino (CHBP1) e suíno (CHSP1), por terem induzido forte efeito hipotensor em SHR. Para avaliar a influência dos hidrolisados na fisiologia renal foram realizadas as seguintes medidas: depuração plasmática de creatinina endógena (*clearance* de creatinina) para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), e o *clearance* de lítio para estimar a manipulação tubular proximal de sódio nos animais. A administração oral do hidrolisado CE90ACE promoveu redução significativa da TFG e induziu maior excreção de sódio pós-proximal, quando comparada ao controle que recebeu água. Por outro lado, os hidrolisados CHBP1 e CHSP1 apresentaram valores de *clearance* de creatinina similares ao grupo que recebeu água e diferentes do grupo que recebeu o lisinopril. Após a administração oral dos hidrolisados CHBP1 e CHSP1 não houve diferença na reabsorção de sódio ($p > 0,05$) entre os animais dos grupos experimentais e controle. Esses resultados sugerem que o mecanismo pelo qual o hidrolisado CE90ACE induz a diminuição da pressão arterial nos SHR não é o mesmo pelo qual atua os hidrolisados de colágeno CHBP1 e CHSP1. Por não ter promovido alterações significativas na função renal dos SHR, o efeito hipotensor dos hidrolisados CHBP1 e CHSP1 pode ser mediado por outros mecanismos, além do sistema renina-angiotensina.

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF COMMERCIAL PROTEIN HYDROLYSATES ON KIDNEY FUNCTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

ABSTRACT

The kidneys are directly involved in the control of systemic blood pressure since they secrete angiotensin II, the synthetic substrate for ACE, in addition to controlling the reabsorption or secretion of NaCl. The majority of the known actions of Angiotensin II are mediated by the activation of type AT receptors, including vasoconstriction, antinatriuresis, aldosterone secretion, sympathetic activation, inhibition of rennin synthesis and cell proliferation. The objective of the present study was to assess the influence of commercial protein hydrolysates on the kidney function of spontaneously hypertensive rats (SHR). The casein hydrolysate (CE90ACE) and the P1 fractions (PM<30-50 kDa) of bovine (BCHP1) and porcine (PCHP1) collagen hydrolysates were chosen for this study, since they induced a strong hypotensive effect of SHR. To evaluate the influence of the hydrolysates on kidney physiology were taken the following measurements: endogenous plasmatic creatinine clearance to estimate the glomerular filtration rate (GFR), and lithium clearance to estimate the proximal tubular sodium handling in the animals. The oral administration of the hydrolysate CE90ACE promoted a significant reduction in GFR and induced greater post-proximal sodium excretion when compared to the control that received only water. On the other hand, the hydrolysates BCHP1 and PCHP1 presented creatinine clearance values similar to those of the group that received water and different to those of the group that received lisinopril. After the oral administration of the hydrolysates BCHP1 and PCHP1, there was no difference ($p>0.05$) between the experimental and control groups of animals with respect to sodium reabsorption. These results suggest that the mechanism by which the hydrolysate CE90ACE induces a decrease in blood pressure in SHR is not the same as that by which the collagen hydrolysates BCHP1 and PCHP1 act. Since they failed to promote significant alterations in the kidney function of SHR, the hypotensive effect of the hydrolysates BCHP1 and PCHP1 could be mediated by other mechanisms apart from the rennin-angiotensin system.

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença poligênica que resulta de anormalidades dos mecanismos de controle da pressão arterial. Grande número de substâncias biologicamente ativas pode interagir com diferentes sistemas fisiológicos de maneira complexa e com redundância para garantir a homeostasia cardiovascular (Ribeiro e Florêncio, 2000).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempenha importante função na regulação da pressão arterial e na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico. A angiotensina II atua como principal mediador do SRAA e a hiperatividade desse sistema tem sido relacionada com o desenvolvimento da hipertensão e de outras formas de doenças cardiovasculares e renais. Os agentes que bloqueiam farmacologicamente o SRAA reduzem a pressão por mecanismos diversos, como redução da atividade vasoconstritora da angiotensina II, aumento na concentração de bradicinina, redução do tônus simpático, melhora da função endotelial e remodelação estrutural dos vasos sanguíneos (Santos, Fagundes e Silva, 2000).

O rim tem como função primária a filtração do sangue, com isso ele participa da manutenção do meio extracelular, necessário para o funcionamento das células do organismo, excreta produtos do metabolismo e ajuda a excreção urinária da água e eletrólitos. Outras funções são: a secreção de hormônios que participam da regulação hemodinâmica renal e sistêmica, tais como a renina, aldosterona, angiotensina II, prostaglandinas e a bradicinina, além da produção de eritropoetina, que regula a síntese de glóbulos vermelhos e de regular o metabolismo ósseo (Silbernagl e Despopoulos, 2003).

O néfron é a unidade básica funcional do rim, composta pelo glomérulo e por um sistema tubular que reabsorve e secreta várias substâncias até a formação da urina que é expelida pelo ducto coletor. Pela reabsorção, os rins controlam a excreção de água e sais de acordo com a necessidade do organismo, mantendo constantes o volume e a osmolaridade do espaço extracelular (Guyton e Hall, 2001).

Variações da pressão arterial provocam efeitos significativos sobre a excreção renal de água e de sódio. Estes efeitos são denominados diurese por pressão e natriurese por pressão e são cruciais para a regulação da pressão arterial e dos volumes dos líquidos corporais. A diurese de pressão se refere ao efeito da pressão sanguínea elevada aumentar o volume urinário excretado, enquanto a natriurese de pressão significa o aumento da excreção de sódio provocado pela elevação da pressão sanguínea (Guyton e Hall, 2001).

Dessa forma, os rins estão diretamente relacionados com o controle da hipertensão arterial sistêmica por secretarem a angiotensina II, que é o substrato sintético da ECA, além do controle da reabsorção ou secreção de NaCl. A maioria das ações conhecidas da angiotensina II é mediada pela ativação de receptores do tipo AT, incluindo vasoconstrição, antinatriurese, secreção de aldosterona, ativação simpática, inibição da síntese de renina e crescimento e proliferação celular (Carvalho et al., 2005).

No rim, a angiotensina II causa constrição das arteríolas eferentes, aumentando a resistência dos capilares glomerulares ao fluxo de sangue. Isto eleva a pressão hidrostática glomerular, ao mesmo tempo em que reduz o fluxo sanguíneo renal, aumentando levemente a filtração glomerular e causando aumento da reabsorção de sódio e água. Já a aldosterona aumenta a reabsorção de sódio, especialmente nos túbulos coletores corticais. A reabsorção de sódio aumentada também é associada à reabsorção maior de água e à secreção de potássio. Inversamente, a supressão da formação de angiotensina e aldosterona diminui a filtração glomerular e a reabsorção tubular, permitindo que os rins excretem quantidades maiores de sódio (Guyton e Hall, 2001). Estudar a função renal é importante porque a influência de drogas ou substâncias pode ser facilmente visualizada pela alteração desses mecanismos.

Nesta etapa do trabalho, pesquisou-se a influência dos hidrolisados de caseína (CE90ACE), colágeno bovino fração P1 (CHBP1) e colágeno suíno fração P1 (CHSP1) na função renal de ratos espontaneamente hipertensos. De acordo com os resultados do capítulo 1, os hidrolisados CE90ACE, CHBP1 e CHSP1 por terem promovido um forte efeito hipotensor *in vivo*, foram escolhidos para o estudo da função renal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estudo da função renal

Os métodos utilizados para avaliar a influência do hidrolisado na fisiologia renal foram: medida de depuração plasmática de creatinina endógena (*clearance* de creatinina) para estimar a taxa de filtração glomerular, e o *clearance* de lítio para estimar a manipulação tubular proximal de sódio nos animais.

Para o ensaio experimental, foram utilizados 15 ratos machos espontaneamente hipertensos, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo até cinco animais, em ambiente climatizado com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ de umidade relativa, com controle automático do ciclo claro/escuro a cada 12 horas. Dieta comercial (LABINA[®]) e água foram fornecidas *ad libitum*.

Após 10 semanas de aclimação, os SHR (14 semanas de idade, com pressão arterial sistólica > 160 mmHg) foram divididos aleatoriamente em três grupos de cinco animais ($n=5$) da seguinte forma: grupo experimental (E), recebeu solução de hidrolisado; grupo controle negativo (CN), recebeu água destilada; grupo controle positivo (CP), recebeu o agente anti-hipertensivo lisinopril (20 mg/kg de peso corporal). Durante o experimento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, sem restrição de movimentos (Figura 1).

A filtração glomerular e a manipulação renal de sódio foram estimadas durante 120 minutos. Doze a 14 horas antes dos testes funcionais, foi administrado aos animais cloreto de lítio na dose 0,06 mEq/100g de peso corporal por gavagem, deixando-os em jejum, mas com livre acesso à água. Após este período, os animais receberam água por gavagem em um volume correspondente a 5 % do peso corporal, seguida de uma nova administração de igual volume após 60 minutos. As amostras de sangue foram coletadas via vasos da cauda, sob anestesia com éter etílico ou por punção cardíaca na ocasião do sacrifício.



Figura 1: Gaiola metabólica

Dosagem de lítio, sódio, potássio e creatinina

As concentrações plasmáticas e urinárias de lítio, sódio e potássio foram determinadas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo) e os resultados foram expressos em mEq/L. As concentrações de creatinina foram determinadas espectrofotometricamente (Espectofotômetro digital B342 II, Instruments Laboratory, Genesys V, Lexington, MA, USA) pela técnica do picrato alcalino (Xavier; Magalhães e Gontijo, 2000). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Metabolismo Hidro-Salino (NMCE/ FCM).

Cálculo das variáveis para o estudo da função renal

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

Volume urinário: V'

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

Filtração glomerular: FG ou Ccr

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

$$C_{Cr} = \frac{U_{Cr} \times V}{P_{Cr}}$$

onde:

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

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

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

Fração da excreção de sódio: FE_{Na}

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

$$FE_{Na} = \frac{U_{Na} \times V}{P_{Na} \times C_{Cr}} \times 100$$

onde:

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

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

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

C_{Cr} = *clearance* de creatinina

Fração de excreção proximal de sódio: FEP_{Na}

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

$$FEP_{Na} = \frac{C_{Li}}{C_{Cr}} \times 100$$

onde:

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

C_{Cr} = *clearance* de creatinina

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

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

$$FEPP_{Na} = \frac{C_{Na}}{C_{Li}} \times 100$$

onde:

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

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

Fração da excreção de potássio: FE_K

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

$$FE_K = \frac{U_K \times V}{P_K \times C_{Cr}} \times 100$$

onde:

U_K = concentração de sódio na urina em mEq/L ;

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

P_K = concentração de sódio no plasma em mEq/L ;

C_{Cr} = *clearance* de creatinina

2.2 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão e submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Bonferroni para confronto entre as médias. O software Statistica for Windows (1995) foi utilizado no intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os hidrolisados analisados no capítulo 1, os hidrolisados de colágeno bovino (CHBP1) e suíno (CHSP1), obtidos após ultrafiltração em membrana de 30kDa, e o hidrolisado da caseína (CE90ACE) foram os que induziram maior redução na pressão arterial dos animais. O CHBP1 produziu decréscimo significativo de 21,16 mmHg após 5 horas da administração oral de 500 mg/kg de peso corporal do hidrolisado. Já o CHSP1 promoveu redução de 25,83 e 21,94 mmHg, respectivamente, após 1 e 3 horas da ingestão por via oral. O hidrolisado CE90ACE induziu efeito hipotensor similar, promovendo decréscimo de 25 mmHg após 3 horas e 21,33 mmHg após 5 horas da administração oral de 100 mg/kg de peso corporal do hidrolisado.

A taxa de filtração glomerular (TFG) é uma variável influenciada pela: pressão arterial, que funciona como pressão de filtração na entrada do glomérulo; pela superfície de filtração, que depende do número de néfrons intactos nos rins; e pela permeabilidade do filtro glomerular à água. Assim, se a pressão arterial diminuir, o fluxo sanguíneo é reduzido e a TFG também diminui. Caso a pressão arterial sistêmica caia abaixo de 80 mmHg, a filtração glomerular é interrompida (Guyton e Hall, 2001).

Para medir a TFG, a creatinina endógena pode ser utilizada como substância indicadora, uma vez que esta é filtrada livremente, não sendo reabsorvida nem secretada, portanto sua depuração pode ser considerada como depuração do volume plasmático, por unidade de tempo (Silbernagl e Despopoulos, 2003).

Na Figura 2 estão apresentados os valores para o *clearance* de creatinina, ou taxa de filtração glomerular (TFG), após a administração oral dos hidrolisados CE90ACE, CHBP1 e CHSP1. O grupo que recebeu o hidrolisado da caseína CE90ACE, apresentou redução significativa da TFG, quando comparada ao controle que recebeu água, e estatisticamente similar à induzida pela droga lisinopril. A redução da TFG indica que a redução da pressão arterial influenciou diretamente a função renal, já que esta funciona como pressão de filtração na entrada do glomérulo. Os grupos que receberam as frações derivadas do colágeno bovino e suíno apresentaram valores de *clearance* de creatinina similares ao grupo que recebeu água e diferentes do grupo que recebeu o lisinopril.

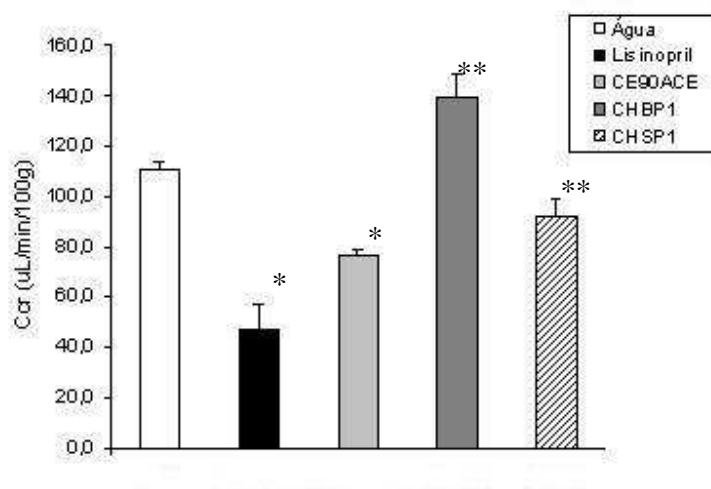


Figura 2: Taxa de filtração glomerular estimada pelo *clearance* de creatinina após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (* $p < 0,05$ versus Água, ** $p < 0,05$ versus Lisinopril, test Bonferroni). Resultados apresentados com média de 5 animais \pm erro padrão.

A magnitude da excreção de diferentes substâncias na urina representa a soma algébrica de três processos renais: filtração glomerular, reabsorção de substâncias dos túbulos renais para o sangue e secreção de substâncias do sangue para os túbulos renais. Cada um destes processos é regulado de acordo com as necessidades do corpo. Por exemplo, quando há excesso de sódio no corpo, a filtração do sódio aumenta e uma menor parcela do sódio filtrado é reabsorvida, resultando num aumento de excreção urinária de sódio. Na verdade, variações na filtração glomerular e na reabsorção tubular usualmente atuam de maneira coordenada para produzir as alterações necessárias na excreção renal (Guyton e Hall, 2001).

No organismo humano, em média, 99% da quantidade de sódio que é filtrada é reabsorvida, ou seja, a fração de excreção de sódio (FE_{Na}) corresponde a aproximadamente 1%. A fração de excreção de sódio e as demais variáveis (fração de excreção proximal; fração de excreção pós-proximal e excreção de potássio), dosam a ocorrência de reabsorção ou secreção de eletrólitos ao longo dos ductos do néfron (Silbernagl e Despoupoulos, 2003).

Não houve diferença estatística na reabsorção de sódio entre os animais dos grupos experimentais e controle (Figura 3). A administração oral do hidrolisado CE90ACE foi a que promoveu maior excreção de sódio. A indução da excreção de sódio traz

benefícios ao organismo, já que a longo prazo a retenção deste eletrólito pode implicar no desenvolvimento da hipertensão arterial. Por outro lado, a reabsorção de sódio mais acentuada foi observada no grupo que recebeu o hidrolisado CHBP1. O aumento da reabsorção de sódio pode ter ocorrido como mecanismo contra-regulatório do organismo, em resposta à redução da pressão arterial induzida pelo hidrolisado.

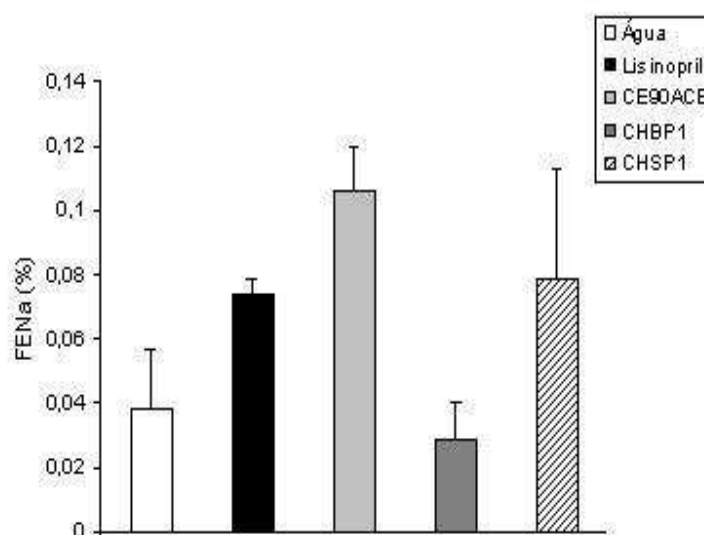


Figura 3: Fração de excreção de sódio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal). Resultados apresentados com média de 5 animais \pm erro padrão.

A excreção de sódio no túbulo proximal foi maior para o grupo que recebeu o medicamento lisinopril, apesar da menor TFG. Neste caso, o resultado apresentado pelo grupos que receberam os hidrolisados foram similares ao do grupo controle que recebeu água (Figura 4).

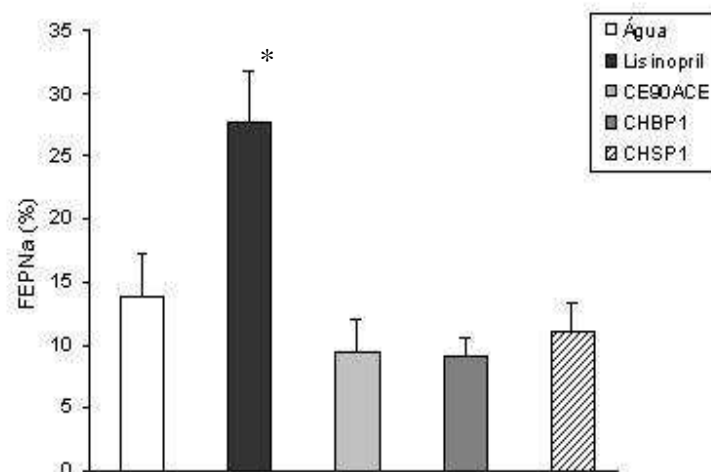


Figura 4: Fração de excreção proximal de sódio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (* $p < 0,05$ versus Água, test Bonferroni). Resultados apresentados com média de 5 animais \pm erro padrão.

Em relação a excreção de sódio pós-proximal ($FEPP_{Na}$), a administração do hidrolisado CE90ACE induziu um aumento significativo da $FEPP_{Na}$, quando comparado aos demais grupos analisados, sendo estatisticamente diferente do grupo controle que recebeu água (Figura 5).

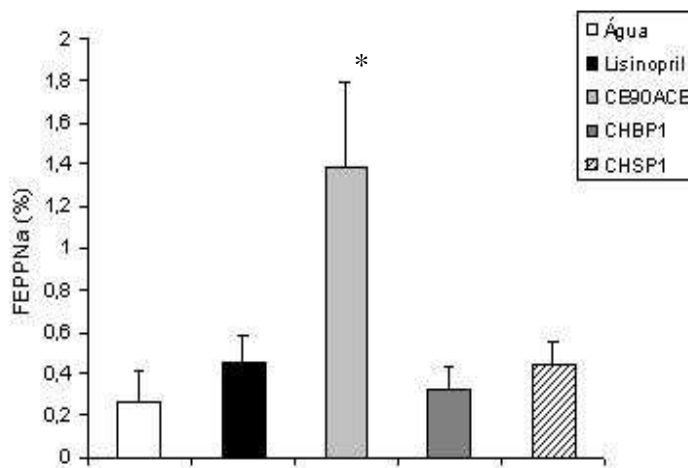


Figura 5: Fração de excreção pós-proximal de sódio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (* $p < 0,05$ versus Água, test Bonferroni). Resultados apresentados com média de 5 animais \pm erro padrão.

Como a angiotensina II tem vários efeitos importantes no aumento da reabsorção tubular de sódio, nível reduzido de angiotensina II diminui a reabsorção tubular de sódio e água, aumentando assim a excreção de sódio e água. Depois do bloqueio da formação de angiotensina II, como ocorre após a administração de um inibidor da ECA, há uma perda inicial de sódio e água, mas a queda da pressão sanguínea compensa este efeito e a excreção de sódio é novamente restaurada ao normal (Guyton e Hall, 2001).

Apesar da redução na TFG apresentada pelo hidrolisado CE90ACE (Figura 2), a FE_{Na} e $FEPP_{Na}$ foram maiores, quando comparado aos grupos que receberam os demais hidrolisados e água. Este resultado é interessante porque o efeito do hidrolisado CE90ACE na pressão arterial não foi minimizado pelos mecanismos contra-regulatórios.

A fração de excreção de potássio (FE_K) média varia de 2% a 150% do volume filtrado, isso porque o potássio pode ser secretado no túbulo distal. Quanto maior a reabsorção de sódio, maior a excreção de potássio, já que na maioria das vezes esse processo é mediado através do transporte ativo promovido pela enzima Na/K-ATPase, que bombeia sódio da célula para o sangue e potássio na direção contrária (Silbernagl e Despopoulos, 2003).

Na Figura 6 estão apresentados os resultados da excreção de potássio. Observa-se que o efeito apresentado pelos grupos experimentais foi similar ao do grupo controle que recebeu água, ao passo que com o medicamento lisinopril, houve um aumento da excreção do potássio.

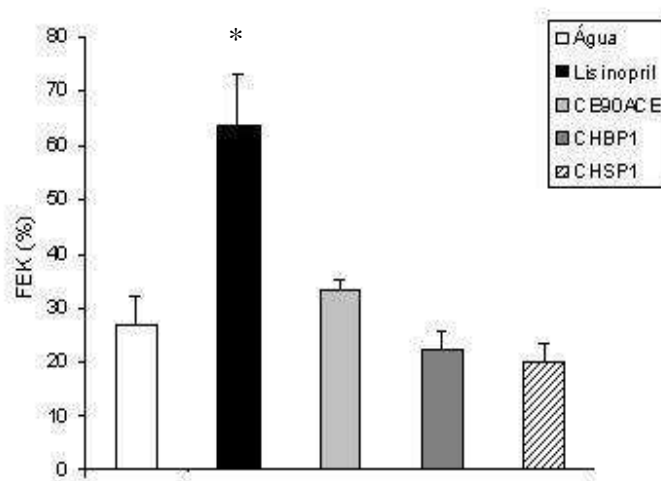


Figura 6: Fração de excreção de potássio após a administração dos hidrolisados CE90ACE (100 mg/kg de peso corporal), CHBP1 e CHSP1 (500 mg/kg de peso corporal) (* $p < 0,05$ versus Água, test Bonferroni). Resultados apresentados com média de 5 animais \pm erro padrão.

A redução significativa da pressão arterial dos SHR após a administração do hidrolisado de caseína (CE90ACE), promoveu redução na taxa de filtração glomerular, determinada pelo *clearance* de creatinina, quando comparada ao grupo controle. Efeito semelhante sobre o *clearance* de creatinina e a pressão arterial, foi reportado por Costa et al. (2005) após a administração intraperitoneal do hidrolisado protéico de soro de leite em SHR. Neste estudo, os autores também observaram forte efeito anti-natriurético, como mecanismo compensatório do organismo, em resposta à diminuição da pressão arterial, o que não foi observado para o hidrolisado CE90ACE. Ao contrário, os resultados obtidos mostraram que a administração do hidrolisado CE90ACE induziu maior excreção de sódio, indicando um efeito positivo, já que uma elevada reabsorção de sódio pelo túbulos renais acarreta retenção de água e conseqüentemente aumento da pressão arterial.

Esses resultados indicam que o efeito hipotensor apresentado pelo hidrolisado CE90ACE possa ser mediado pelo sistema renina-angiotensina através da inibição da ECA. Segundo Guyton e Hall (2001) tanto o efeito direto da angiotensina sobre o rim quanto seu efeito através da aldosterona são importantes no controle da pressão arterial, pois resultam em retenção de sal e água, produzindo elevação crônica da pressão arterial.

Por outro lado, os hidrolisados CHBP1 e CHSP1 apresentaram valores de *clearance* de creatinina similares ao grupo que recebeu água e diferentes do grupo que

recebeu o lisinopril. Wu e Ding (2001) também observaram respostas diferentes em relação a atividade anti-hipertensiva do hidrolisado de soja e o medicamento captopril. Nesse estudo, os autores avaliaram o efeito *in vivo* da atividade da ECA no soro, na aorta e no pulmão de SHR. Após um mês de administração diária dos peptídeos da soja não foi observado efeito significativo sobre a atividade da ECA no soro, na aorta e no pulmão, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, a administração do captopril promoveu aumento significativo da atividade da ECA no soro e redução na atividade da ECA na aorta, sugerindo que o hidrolisado de soja e a droga captopril possam atuar por diferentes mecanismos anti-hipertensivos. Estudos anteriores indicam que a administração de inibidores da ECA pode levar ao aumento nos níveis plasmáticos da ECA (Fyhrquist, Horting e Gronhagen-Riska, 1982; Kohzuki et al., 1991). Porém, o mecanismo envolvido com o aumento da atividade da ECA no soro após a administração contínua de captopril, ainda não é conhecido (Wu e Ding, 2001) .

4. CONCLUSÕES

O hidrolisado da caseína (CE90ACE) induziu uma redução na filtração glomerular dos animais e promoveu maior excreção de sódio na porção pós-proximal do ducto renal, provavelmente devido a um efeito vasodilatador, decorrente da inibição da ECA.

Os demais hidrolisados analisados, CHBP1 e CHSP1, não induziram alterações significativas na função renal dos animais, sugerindo que o efeito dos colágenos hidrolisados na redução da pressão arterial possa ser mediado por outros mecanismos, além do sistema renina-angiotensina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; SILVA, L. B. B.; SALGADO, M. C. O. Aspectos farmacológicos dos inibidores da ECA e dos receptores de angiotensina II. **Revista Brasileira de Hipertensão**, vol.12, n. 2, p.97-102, 2005.

COSTA, E. L.; ALMEIDA, A. R.; NETTO, F. M.; GONTIJO, J. A. R. Effect of intraperitoneally hydrolysed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.12, p.1817-1824, 2005.

FYHRQUIST, F.; HORTING, L.; GRONHAGEN-RISKA, C. Induction of angiotensin converting enzyme by captopril in cultured human endothelial cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol.55, p.783-786, 1982.

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

KOHZUKI, M.; JOHNSTON, C. L.; CHAI, S. Y.; JACKSON, B.; PERICH, R.; PAXTON, D.; MENDELSON, F. A. O. Measurement of angiotensin converting enzyme induction and inhibition using quantitative in vitro autoradiography: tissue selective induction after chronic Lisinopril treatment. **Journal of Hypertension**, v.9, p.579-587, 1991.

RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. **Revista Brasileira de Hipertensão**, vol.7, n.3, p.293-302, 2000.

SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES MOURA, C. R.; SILVA, A. C. S. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Revista Brasileira de Hipertensão**, vol.7, n. 3, p.227-236, 2000.

SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. **Fisiologia: Texto e Atlas**. 5 ed. Artmed: São Paulo, 2003. 436p.

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

WU, J.; DING, X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.1, p.501-506, 2001

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

CONCLUSÕES GERAIS

- ▶ Os hidrolisados protéicos com baixo peso molecular apresentaram maior potência inibitória da Enzima Conversora de Angiotensina em comparação com os colágenos hidrolisados bovino e suíno e suas frações, tanto antes como após a digestão gastrintestinal *in vitro*.
- ▶ Independente da fonte protéica, todos os hidrolisados analisados foram capazes de induzir redução significativa da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos, exceto os colágenos hidrolisados bovino (CHB) e suíno (CHS) não fracionados. Os hidrolisados da caseína (CE90ACE), soro de leite (WE80BG), colágeno bovino (CHBP1) e colágeno suíno (CHSP1 e CHSP3) foram os produtos mais eficientes em reduzir a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos, apesar de apresentarem peso moleculares diferentes.
- ▶ A ultrafiltração dos colágenos hidrolisados implicou em aumento da potência inibitória da Enzima Conversora da Angiotensina, bem como maior eficiência em reduzir a pressão arterial dos animais;
- ▶ A administração oral crônica dos hidrolisados WE80BG e CHBP1 induziu uma redução progressiva e significativa da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos, comparada à pressão basal deste grupo.
- ▶ O hidrolisado CE90ACE induziu uma redução na filtração glomerular dos animais, provavelmente devido a um efeito vasodilatador e promoveu maior excreção de sódio na porção pós-proximal do ducto renal. Os demais hidrolisados analisados, CHBP1 e CHSP1, não induziram alterações significativas na função renal dos animais, indicando que o efeito destes hidrolisados na redução da pressão arterial possa ser mediado por outros mecanismos, além do sistema renina-angiotensina.

Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que as enzimas gastrintestinais exercem grande influência sobre atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados protéicos

comerciais, podendo aumentar ou diminuir o efeito hipotensor *in vivo*. Porém, a aplicação da digestão gastrintestinal *in vitro* unicamente não é capaz de predizer sobre a atividade biológica dos hidrolisados, pois além da digestão gastrintestinal há outros fatores e/ou mecanismos que podem estar envolvidos com o decréscimo da pressão arterial produzido pela ação dos peptídeos, o que levaria também a uma não correlação dos resultados *in vitro* e *in vivo*.