

UNIVERSIDADE DOS AÇORES



*Investigação de enzimas proteolíticas
na produção de um leite mais digerível
Impacto do leite modificado na
hipertensão arterial*

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Vera Raquel de Medeiros

Ponta Delgada, Novembro de 2010

UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



*Investigação de enzimas proteolíticas na produção de um leite
mais digerível
Impacto do leite modificado na hipertensão arterial*

Área Científica – Ciências Biomédicas

Vera Raquel de Medeiros

Orientadora

Professora Doutora Elisabete Maria de Castro Lima

Co-orientador

Professor Doutor José António Bettencourt Baptista

Ponta Delgada, Novembro de 2010

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ix
PREFÁCIO	xi
ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1. Leite	5
1.1. Constituintes proteicos principais do leite.....	7
1.1.1. Proteínas do soro.....	8
1.1.2. Caseínas	8
1.1.2.1. Propriedades químicas e variantes genéticas	8
1.1.2.2. Estrutura das micelas de caseínas.....	10
1.1.2.3. Modificações químicas e enzimáticas das proteínas do leite	13
Capítulo 2. Alergia alimentar às proteínas do leite bovino	17
2.1. Hidrolisados proteicos	19
2.2. Inconvenientes dos hidrolisados proteicos	21
Capítulo 3. Enzimas proteolíticas.....	25
3.1. Bromelaína.....	27
3.1.1. Propriedades terapêuticas da bromelaína.....	28
3.1.2. Aplicações da bromelaína na indústria	29
Capítulo 4. Propriedades funcionais dos péptidos do leite.....	31
4.1. Efeito dos péptidos do leite no controlo da hipertensão.....	33
4.1.1. Sistema renina-angiotensina (RAS).....	35
4.2. Acção inibitória dos péptidos do leite na enzima conversora da angiotensina (ACE)	37
4.3. Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das propriedades dos péptidos do leite	37
MATERIAIS E METODOLOGIAS	41
5.1. Preparação das amostras	43
5.1.1. Leite meio gordo termizado	44
5.1.2. Leite magro e meio gordo UHT.....	45
5.2. Reagentes utilizados	45

5.3. Metodologias utilizadas.....	46
5.3.1. HPLC das fracções proteicas do leite bovino	46
5.3.2. Diálise das amostras de leite bovino UHT.....	47
5.3.3. Análise do efeito anti-hipertensivo do leite modificado pela inibição da ACE..	47
5.3.4. Determinação da velocidade máxima da ACE	48
5.3.5. Determinação do tipo de inibição	49
5.4. Análise sensorial ao leite meio gordo UHT modificado	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1. Escolha da enzima proteolítica	52
6.2. Produção de um leite mais digerível.....	53
6.2.1. Leite magro UHT	53
6.2.2. Leite meio gordo UHT	55
6.2.3. Leite meio gordo termizado	57
6.2.4. Leite meio gordo termizado com pré-aquecimento inicial	58
6.3. Análise das propriedades anti-hipertensivas do leite modificado	62
6.3.1. Determinação da velocidade máxima da ACE	63
6.3.2. Análise de amostras de leite UHT e leite termizado.....	63
6.3.2.1. Sem diálise	63
6.3.2.2. Após diálise	65
6.3.3. Determinação do tipo de inibição	66
6.4. Análise sensorial ao leite meio gordo UHT modificado	68
CONCLUSÃO	71
PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	73
BIBLIOGRAFIA.....	75
ANEXOS.....	83
Anexo 1.....	854
Anexo 2.....	875
Anexo 3.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Suplementos alimentares à base de proteínas do lactosoro	7
Figura 2 – Micela de caseína (modelo simplista).....	11
Figura 3 – Micela de caseína (modelo alternativo).....	11
Figura 4 – Diagrama esquemático do modelo estrutural da micela de caseína proposto por McMahon et al. (2008). [A] – Visão à escala da micela de caseína. [B] – Porção da periferia da micela de caseína	12
Figura 5 – Produtos derivados de caseínas resultantes da precipitação ácida.....	14
Figura 6 – Representação esquemática dos receptores gustativos	22
Figura 7 – Funcionalidades dos péptidos bioactivos derivados das proteínas do leite	32
Figura 8 – Medicamentos sintéticos para o controlo da hipertensão arterial	34
Figura 9 – Sistema renina-angiotensina (RAS).....	36
Figura 10 – Diagrama síntese do fluxograma da produção do leite na fábrica Unileite	42
Figura 11 – Unileite - situada na freguesia dos Arrifes, concelho de Ponta Delgada	43
Figura 12 – Procedimento utilizado para a preparação das amostras de leite termizado	44
Figura 13 – Procedimento utilizado para a preparação das amostras de leite UHT.....	45
Figura 14 – HPLC utilizado na análise das amostras de leite	46
Figura 15 – Célula de diálise	47
Figura 16 – Procedimento utilizado para a verificação das propriedades anti-hipertensivas do leite modificado.....	48
Figura 17 – Cabines de prova (DCTD).....	49
Figura 18 – Representação esquemática da composição das amostras na cabine de prova	50
Figura 19 – Razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos <i>versus</i> caseínas (R) de diferentes enzimas proteolíticas, utilizando uma proporção S:E 150:1 mL/mg, e custo em euros por grama de enzima (preços Sigma Aldrich).....	53
Figura 20 – Variação da hidrólise parcial do leite magro UHT por RP-HPLC com diferentes razões S:E (condições de hidrólise e análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). Legenda: AA – aminoácidos livres, 1 – κ -caseína, 2 – α_{S2} -caseína, 3 – α_{S1} -caseína, 4,5 – β -caseína. [A] – S:E = 200:0 mL/mg; [B] – S:E = 200:1 mL/mg; [C] – S:E = 150:1 mL/mg; [D] – S:E = 100:1 mL/mg; [E] – S:E = 75:1 mL/mg; [F] – S:E = 65:1 mL/mg...54	54
Figura 21 – Razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos <i>versus</i> caseínas (R) no leite magro UHT a diferentes tempos de hidrólise, utilizando uma proporção S:E fixa (200:1 mL/mg)55	55
Figura 22 – Comparação do grau de hidrólise do leite meio gordo UHT através do valor de R, utilizando diferentes razões S:E (condições de hidrólise apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”).....	56

Figura 23 – Comparação entre leite magro e leite meio gordo UHT através do valor de R, utilizando diferentes razões S:E (200:0 mL/mg; 200:1 mL/mg; 150:1 mL/mg e 100:1 mL/mg)	56
Figura 24 – Variação da hidrólise parcial do leite meio gordo termizado por RP-HPLC com diferentes razões S:E (condições de hidrólise e análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). Legenda: AA – aminoácidos livres, 1 – κ -caseína, 2 – α_{S2} -caseína, 3 – α_{S1} -caseína, 4,5 – β -caseína. [A] – S:E = 200:0 mL/mg; [B] – S:E = 100:1 mL/mg; [C] – S:E = 75:1 mL/mg.....	57
Figura 25 – Variação da hidrólise parcial do leite meio gordo termizado por RP-HPLC submetido a um aquecimento inicial, variando a temperatura e o tempo (condições de hidrólise e análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). Legenda: AA – aminoácidos livres, 1 – κ -caseína, 2 – α_{S2} -caseína, 3 – α_{S1} -caseína, 4,5 – β -caseína. [A] – 65 °C (30 min) (S:E = 100:1 mL/mg); [B] – 70 °C (30 min) (S:E = 100:0,5 mL/mg); [C] – 80 °C (4 min) (S:E = 100:0,5 mL/mg).....	59
Figura 26 – Razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos <i>versus</i> caseínas (R) no leite meio gordo termizado submetido a um pré-aquecimento inicial de 75 °C, variando o tempo e mantendo constante a razão S:E (100:0,5 mL/mg)	60
Figura 27 – Diagrama síntese da produção do leite funcional na unidade fabril	61
Figura 28 – Determinação da actividade inibitória da ACE por HPLC (condições de análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). [A] – Cromatograma com a representação do HA (controlo); [B] – Cromatograma com a representação do HA numa amostra de leite parcialmente hidrolisado com bromelaína	62
Figura 29 – Cromatogramas referentes à produção de HA ao longo de intervalos pré-definidos utilizados para o cálculo da velocidade da reacção (condições de análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”).....	63
Figura 30 – Percentagem de inibição da ACE das diferentes proporções S:E do leite magro e meio gordo UHT (condições de análise apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”).....	64
Figura 31 – Percentagem de inibição da ACE do leite meio gordo termizado analisado na mesma proporção S:E (100:0,5) mas diferindo no tempo e temperatura de pré-aquecimento inicial (condições de análise apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”)	65
Figura 32 – Curva de Lineweaver-Burk da inibição da ACE pela amostra resultante da hidrólise parcial do leite meio gordo UHT (S:E 100:1) e respectivos parâmetros cinéticos. Vermelho – amostra de leite; azul – controlo (leite meio gordo UHT sem bromelaína).....	67
Figura 33 – Resultados da análise sensorial ao parâmetro “sabor” do leite com bromelaína	69
Figura 34 – Resultados da análise sensorial ao parâmetro “aspecto” do leite com bromelaína.....	70
Figura 35 – Resultados da análise sensorial efectuada ao leite meio gordo UHT com bromelaína <i>versus</i> leite meio gordo UHT convencional. MG – meio gordo	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição em aminoácidos das principais caseínas em moles/moles de proteína (Banks & Dalgleish, 1990).....	9
Tabela 2 – Caseínas do leite bovino, peso molecular, suas variantes genéticas e carga (Banks & Dalgleish, 1990; Fox, 1989).....	10
Tabela 3 – Fórmulas de hidrolisados proteicos. Características e valores de mercado.....	20
Tabela 4 – Resultados do teste de palatabilidade efectuado por Pedrosa et al. (2006) a leites modificados.....	22
Tabela 5 – Classificação das enzimas proteolíticas (Hedstrom, 2002; Barrett et al., 2004).....	26
Tabela 6 – Péptidos obtidos de proteínas lácteas com actividade anti-hipertensiva (Aleixandre et al., 2008).....	39
Tabela 7 – Temperatura, tempo e proporção substrato:enzima (S:E) utilizados no aquecimento inicial das amostras de leite termizado.....	44
Tabela 8 – Reagentes utilizados, grau de pureza e origem.....	46
Tabela 9 – Percentagem de inibição da ACE (e respectivo valor do desvio padrão) das fracções proteicas após diálise, à concentração de 25 mg/mL, utilizando uma amostra de leite meio gordo UHT (100:1).....	65
Tabela 10 – Aminoácidos e abreviaturas (Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, 1983).....	84
Tabela 11 – Péptidos obtidos de proteínas lácteas com actividade anti-hipertensiva e o seu potencial de inibição da ACE com valor de IC ₅₀ inferior a 1000 µM (Hong et al., 2008).....	85

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor José Baptista e Professora Doutora Elisabete Lima, do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD), pela disponibilidade, apoio e auxílio prestado na componente laboratorial, bem como pelas críticas construtivas e sugestões pertinentes durante a elaboração desta dissertação. Acima de tudo, agradeço a amizade e o carinho por mim demonstrado ao longo destes 2 anos de trabalho em conjunto!

Agradeço à Unileite (União das Cooperativas Agrícolas de Lacticínios e de Produtores de Leite da Ilha de S. Miguel) pela oportunidade de realização quer do programa “Estagiar L”, quer do projecto “Empreendedorismo Jovem” feitos em parceria com a Universidade dos Açores, da qual resultou este trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório e professores que estiveram sempre disponíveis para me ajudar.

Um agradecimento especial às minhas duas melhores amigas (elas sabem que são) pela amizade e carinho ao longo destes anos em conjunto, e ao meu namorado pelo amor, dedicação, paciência e apoio incondicional tanto nos bons como nos maus momentos. Obrigada pela tua preciosa ajuda na construção deste trabalho pois sem ti não seria a mesma coisa!

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, Anna e Marcelino, e ao meu mano Bruno, pelo amor e paciência para me aturarem e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Vocês são, sem dúvida, o pilar da minha vida!

A todos um “muito obrigada”!!!

PREFÁCIO

O estudo desta dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas foi elaborado e pensado para a fábrica Unileite, na continuidade de um trabalho prévio efectuado no âmbito do programa Estagiar L. Como a fábrica em questão pretendia desenvolver uma nova gama de produtos lácteos, nomeadamente leites funcionais, sugeriram à Universidade dos Açores, em concreto ao Laboratório de Tecnologia Alimentar, que providenciasse toda a parte científica para o desenvolvimento e criação de um leite funcional de fácil digestão. A análise das características funcionais do produto obtido (concretamente o efeito anti-hipertensivo) surgiu na sequência de um projecto de Empreendedorismo Jovem (DRAIC) proposto pela Unileite em parceria com a Universidade dos Açores e aprovado em Março de 2010.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Aminoácidos

ACE – Enzima conversora da angiotensina

ACN – Acetonitrilo

α -La – α -Lactoalbumina

α_{S1} -CN – α_{S1} -Caseína

α_{S2} -CN – α_{S2} -Caseína

β -CN – β -Caseína

β -Lg A – β -Lactoglobulina A

β -Lg B – β -Lactoglobulina B

BSA – Albumina do soro bovino

Ca²⁺ – Ião cálcio

d.i. – Diâmetro interno

GDL – Glucono-delta-lactona

HA – Ácido hipúrico

HCl – Ácido clorídrico

Hg – Mercúrio

HHL – N-hipuril-histidina-leucina

His-Leu – Dipéptido histidina-leucina

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

IC₅₀ – Concentração necessária para produzir uma inibição de 50%

Ig – Imunoglobulinas

κ -CN – K-Caseína

kDa – Kilo Daltons

KNOS – Sistema quinina-óxido nítrico

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

MeOH – Metanol

Mg²⁺ – Ião magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

R – Razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos/caseínas

RAS – Sistema renina-angiotensina

RP – Fase reversa

S:E – Proporção substrato:enzima

TFA – Ácido trifluoroacético

U – Unidades de enzima

UHT – Ultrapasteurizado

UV – Ultravioleta

γ -CN – γ -Caseína

Zn^{2+} – Ião zinco

$ZnCl_2$ – Cloreto de zinco

λ – Comprimento de onda

Foram ainda utilizadas as seguintes unidades:

°C – temperatura em graus Celsius

mg – miligrama

min – minutos

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

nm – nanómetro

μ L – microlitro

μ m – micrómetro

μ M – micromoles

μ mol/L – micromoles por litro

U/mL – unidades de enzima por mililitro

v/v – volume/volume

RESUMO

O leite representa um componente importante na dieta humana com elevado valor nutritivo. As alergias alimentares associadas à ingestão de leite têm-se tornado um problema emergente na sociedade. Com efeito, surgem cada vez mais no mercado produtos funcionais derivados ou à base de leite como forma de reduzir a incidência de pessoas com intolerância às proteínas do leite de vaca. Deste modo, o objectivo principal do presente trabalho incidiu sobre o desenvolvimento de uma metodologia para a criação de um novo tipo de leite modificado/funcional (a partir de leite cru desnatado) para indivíduos intolerantes às caseínas, utilizando uma enzima proteolítica vegetal adequada para a sua modificação, nomeadamente a bromelaína. Foi pois desenvolvido um método de separação e quantificação das principais proteínas do leite bovino, pequenos péptidos e aminoácidos livres, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), tendo sido analisadas amostras de leite cru desnatado e de leite magro e meio gordo ultrapasteurizado (UHT) com o objectivo de comparar o grau de hidrólise das mesmas. Numa segunda fase do trabalho, o leite modificado (sem e após diálise) foi analisado *in vitro* no sentido de averiguar o seu possível efeito no controlo da hipertensão pela inibição da enzima conversora da angiotensina (ACE). Os tipos de leite analisados apresentaram diferenças em termos de inibição da ACE sendo que o leite UHT registou uma inibição próxima dos 50% e o leite cru desnatado inferior a 20%. A curva de Lineweaver-Burk efectuada revelou que os péptidos do leite modificado comportam-se como inibidores não competitivos. Por último, o leite meio gordo UHT modificado foi submetido a um painel sensorial com o intuito de testar as suas características organolépticas e a sua aceitação junto de potenciais consumidores. Os resultados obtidos foram muito positivos pois 86% das pessoas inquiridas consideraram o leite modificado agradável relativamente ao leite convencional. A criação de um leite funcional a partir de leite cru desnatado é possível. Este novo produto será uma mais valia para a Região, não só por representar um conceito inovador, mas também pelo facto de manter as características do leite ao contrário das outras fórmulas existentes no mercado. Certamente, serão necessários mais estudos para que este produto seja passível de aplicar na indústria tendo em consideração os requisitos de produção da fábrica onde será implementado. Além disso, será fundamental avaliar este tipo de leite funcional *in vivo* como uma fórmula hipoalergénica e hipotensiva.

SUMMARY

Milk represents an important component in human diet with high nutritional value. Food allergies associated to milk intake have become a sinking problem in society. Indeed, functional products derived or based on milk are been introduced in the marked as a form of reducing the incidence of people with intolerance to cow's milk protein. Thus, the main aim of the present work was to develop a methodology for the production of a new functional/modified milk (from skimmed raw milk) for casein intolerant persons, using a proteolytic enzyme to its modification, namely bromelain. For this purpose, it was developed a methodology, for the appropriate separation and quantification of the major bovine milk proteins, small peptides and free amino acids, using high-pressure liquid chromatography (HPLC), in which skimmed raw milk, ultra high temperature (UHT) skim and half skimmed milk samples were analyzed to compare the degree of hydrolysis between them. In the second taske of the work, the modified milk (with and without dialysis) was analyzed *in vitro* in order to find out it's possible effect on blood pressure by inhibiting the angiotensin converting enzyme (ACE). The types of milks analyzed had differences in the inhibition of ACE, the UHT modified milk had a inhibition closer to 50% and the raw skim milk less than 20% in comparison to non-modified UHT and raw milk, respectively. The Lineweaver-Burk plot made show that the modified milk peptides act as a non-competitive inhibitors. At last, the half-skimmed UHT milk was submitted to a sensorial analysis panel with the purpose to verify the organoleptic characteristics and the acceptance of the functional milk in potential consumers. The results obtained were very positive since 86% of the participants found a pleasant taste in the modified milk in comparison with conventional UHT milk. This new product will be an additional gain to the Region of Azores, not only because it represent an innovative concept, but also by the fact that this functional milk preserves the characteristics of the milk unlike other formulas in the marked. Certainly, more studies will be necessary to improve this new milk formula to industrial production, taking into account the requisites of the factory which will be implemented. Furthermore, it is crucial to evaluate this modified milk *in vivo* as hypoallergenic and hypotensive milk formula.

Introdução

O leite é um alimento com um elevado valor nutritivo tendo como componentes mais importantes as caseínas (representando ~80% das proteínas do leite) – β -caseína (β -CN), K-caseína (κ -CN), α_{S1} -caseína (α_{S1} -CN) e α_{S2} -caseína (α_{S2} -CN) – e as proteínas do soro (~20%) – β -lactoglobulinas A e B (β -Lg A e β -Lg B), α -lactoalbumina (α -La), albumina do soro bovino (BSA) e imunoglobulinas (Ig) (Walstra & Jenness, 1984; Mier et al., 2007).

As proteínas mais abundantes do leite, nomeadamente as caseínas e a β -Lg, são responsáveis por inúmeras reacções imunológicas (Sampson, 1999). Há autores que apontam estas proteínas como os principais componentes alergénicos para os seres humanos (Docena et al., 1996; Restani et al., 1999). A alergia às proteínas do leite bovino, ou também designada intolerância às caseínas, constitui a causa mais comum de alergia alimentar nas crianças (Curciarello et al., 2008), afectando, possivelmente, mais de 15% das mesmas (Brill, 2008). O único tratamento para este tipo de alergia é a remoção completa do leite bovino da alimentação ou a sua substituição por fórmulas parcialmente hidrolisadas, como por exemplo, as fórmulas de soja ou produtos com caseínas parcialmente digeridas. As fórmulas à base de soja são amplamente utilizadas, contudo, já ocorreram casos de intolerância à soja, entre 15 a 40% das crianças com alergia às proteínas do leite (Curciarello et al., 2008).

A aplicação de modificações de origem enzimática a alimentos proteicos tem sido um tema muito debatido há algumas décadas (Nakai & Li-Chan, 1989). Existem no mercado mundial fórmulas que incorporam proteínas hidrolisadas de leite de bovino, para satisfazer consumidores específicos (Brill, 2008). Com efeito, a criação de um leite funcional na Região Autónoma dos Açores, com caseínas parcialmente hidrolisadas, pode-se tornar de extrema importância, dado o elevado número de crianças e idosos com problemas face à ingestão de produtos lácteos e seus derivados. Trata-se de um produto praticamente inexistente na região e em Portugal Continental, ao qual está subjacente um conceito inovador.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a pressão sanguínea elevada constitui um factor de risco importante para o enfarte e doenças coronárias. Muitos são os produtos nutricionais e funcionais associados a uma diminuição da pressão sanguínea, como por exemplo suplementos de L-arginina, ácido clorogénico, chá, alho, cebolas, gengibre, leite fermentado, proteínas e péptidos de soja. Diversos estudos estabelecem uma relação directa entre a ingestão de leite e a redução da pressão sanguínea. Os péptidos poderão ser benéficos para a hipertensão ao inibirem a enzima conversora da angiotensina (ACE), impedindo assim a conversão da angiotensina I em angiotensina II, que representa um potente vasoconstritor (Chen et al., 2009).

Nesta dissertação de mestrado, estruturada em cinco secções, pretende-se descrever nos capítulos introdutórios seguintes, de forma pormenorizada mas não muito exaustiva, (1) o leite e suas propriedades, (2) a intolerância ou alergia ao leite bovino, que afecta um grande número de crianças, e o papel dos hidrolisados proteicos como alternativa às proteínas do leite, (3) a utilização de enzimas proteolíticas para a obtenção dos referidos hidrolisados e (4) as propriedades funcionais dos péptidos resultantes da hidrólise das proteínas do leite, nomeadamente, no que respeita ao controlo da hipertensão. A segunda secção refere-se às metodologias desenvolvidas para: modificar parcialmente as caseínas do leite bovino através de uma enzima proteolítica vegetal, monitorizar o processo, averiguar o efeito anti-hipertensivo do leite obtido e respectivas fracções e avaliar a aceitabilidade do leite modificado. Na terceira secção apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos com o trabalho experimental desenvolvido. Nas secções quatro e cinco enumeram-se, respectivamente, as conclusões deste trabalho e as perspectivas de trabalho futuro.

Capítulo 1

Leite

O consumo humano de leite de origem animal, principalmente de vaca, cabra e ovelha, começou há 11.000 anos com a domesticação do gado em especial no Oriente Médio, impulsionando a Revolução Neolítica. Durante a Antiguidade e a Idade Média, o leite era consumido fresco ou na forma de queijo, por ser difícil a sua conservação. A Revolução Industrial na Europa, trouxe a possibilidade de transportar o leite fresco de zonas rurais às grandes cidades, graças a melhorias no sistema de transportes e na indústria do processamento do leite, como por exemplo a pasteurização, sugerida para ser usada no leite por Franz von Soxhlet¹ em 1886. Estas inovações possibilitaram que o leite ganhasse um aspecto mais saudável, tempos de conservação mais previsíveis e processamento mais higiénico (Pereira et al., 2006). Na primeira metade do século XX, estudos nutricionais mostraram que o leite fornece cerca de 66 kcal por 100 g, constituindo um alimento completo e adequado para o consumo humano, rico em nutrientes importantes, tais como vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento dos organismos (Maijala, 2000).

O leite é um fluido química e biologicamente complexo contendo uma grande variedade de constituintes, sintetizados no interior da glândula mamária, e possuindo características físicas únicas. O leite bovino tem uma densidade média de 1,032 g/cm³ sendo constituído maioritariamente por água, proteínas, hidratos de carbono e lípidos com elevada importância nutricional e tecnológica. Presentes em menores quantidades surgem componentes minerais, nomeadamente, os iões cálcio, sódio, potássio, magnésio e cloro, compostos solúveis em água e em lípidos, transferidos directamente do plasma sanguíneo, nomeadamente, proteínas do sangue, vestígios de enzimas e outros intermediários sintetizados na glândula (Banks & Dalgleish, 1990). A secreção láctea obtida dias antes e depois do parto denomina-se por colostro. Trata-se de uma forma de leite naturalmente enriquecida com nutrientes fundamentais para o sistema imunológico, crescimento e desenvolvimento das crias nos primeiros dias de vida dos mamíferos. Este fluido biológico tem um enorme potencial para o tratamento de determinadas doenças, tais como: doenças cardiovasculares, diabetes, diminuição dos níveis de colesterol, poliomielite, artrite reumatóide, etc (Uruakpa et al., 2002). Os componentes proteicos do leite podem ser divididos, de acordo com a sua solubilidade a pH 4,6 a 20 °C, em caseínas, que representam 80% das proteínas do leite, e em proteínas do soro (20%) (Walstra & Jenness, 1984; Veloso et al., 2002).

¹**Franz von Soxhlet (1848-1926)** – Químico e microbiologista alemão responsável pela aplicação da pasteurização do leite como forma de conservação e pela invenção do sistema de extracção conhecido pelo seu nome (Soxhlet) (wikipédia, 2009).

1.1. Constituintes proteicos principais do leite

1.1.1. Proteínas do soro

As proteínas do soro representam a parte aquosa do leite ou soro derivado da separação do coágulo que resulta da precipitação das proteínas do leite por enzimas proteolíticas ou ácidas (Zadow, 1994). As proteínas do soro, solúveis a pH 4.6, são constituídas na sua maioria pelas β -Lg A e B e α -La, surgindo na proporção 3:1 (w/w). A BSA e a Ig também são consideradas proteínas do soro (Walstra & Jenness, 1984). Alguns estudos pré-clínicos em roedores sugerem que as proteínas do soro podem influenciar a produção de glutatião e, por conseguinte, possuir propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas. No entanto, não existe informação detalhada sobre o efeito destas proteínas em humanos (Hakkak et al., 2001; Xiao et al., 2006).

As proteínas do soro poderão ser de grande interesse para a saúde humana pois podem representar fórmulas nutricionais simples para prevenção de problemas cardíacos ou suplementação para diversas doenças (Krissansen, 2007). As proteínas do soro são comercializadas nas mais diversas formas, sendo vistas como uma fonte importante na comunidade consumidora de suplementos nutricionais (Marshall, 2004). Apesar de existirem referências a alergias provocadas por proteínas do soro, as alergias mais comuns são provocadas por caseínas (Wal, 2004; Burks et al., 2001).



Figura 1 – Suplementos alimentares à base de proteínas do lactosoro

As proteínas do soro contêm todos os aminoácidos essenciais, apresentando elevadas concentrações quando comparadas com outras fontes proteicas de origem vegetal como o milho, trigo, soja ou o glúten (Marshall, 2004). De acordo com Balbis et al. (2009) e Anthony et al. (2001), as proteínas do soro contêm uma maior concentração dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. Estes aminoácidos, particularmente a leucina, são factores importantes no crescimento e reparação dos tecidos. As proteínas do soro também

são mais ricas em aminoácidos que contêm enxofre (cisteína e metionina) do que as caseínas, o que sugere que aquelas poderão estar envolvidas no equilíbrio oxidativo dos organismos.

No passado, o soro do leite era considerado um desperdício sendo depositado nos rios ou nas terras. São estimados que anualmente sejam produzidas 600.000 toneladas de proteínas do soro em todo o mundo. A pressão exercida pelos ambientalistas junto das indústrias fez com que, actualmente, o soro seja considerado uma matéria-prima rentável para o desenvolvimento da indústria alimentar mundial (Zadow, 1994). Na Região Autónoma dos Açores, o aproveitamento do soro do leite não atinge os 5%, o que representa uma enorme fonte de poluição, sendo que o desperdício ronda as mil toneladas de soro do leite e o seu destino, maioritariamente, o esgoto (Baptista et al., 1998). É incompreensível que numa conjuntura economicamente difícil, as indústrias de lacticínios regionais não sejam capazes de olhar para o soro do leite como uma matéria-prima, mas sim como um problema que deve ser eliminado ao mais baixo custo possível.

As proteínas do soro representam um tema aliciante e muito explorado nas mais diversas áreas. Não obstante, este não constitui um objectivo desta dissertação de mestrado, deste modo, não irá ser aprofundado.

1.1.2. Caseínas

1.1.2.1. Propriedades químicas e variantes genéticas

As caseínas, fonte primordial de cálcio, fosfato e aminoácidos necessários para o crescimento e energia de todos os mamíferos, têm sido utilizadas comercialmente ao longo do século XX em diversas aplicações, nomeadamente na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (Velooso et al., 2002; McMahon et al., 2008; Liu et al., 2009). As caseínas, componentes proteicos mais importantes do leite, são uma mistura heterogénea de várias proteínas individuais, com diferentes propriedades sendo definidas em termos químicos como proteínas insolúveis a pH 4.6. São formadas pela α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN e κ -CN e ocorrem na proporção 4:1:4:1 (w/w/w/w), respectivamente, com um ponto isoeléctrico médio de 4.8 (Walstra & Jenness, 1984; Liu et al., 2009).

As caseínas são moléculas relativamente pequenas, apresentando uma elevada hidrofobicidade ($\beta > \kappa > \alpha_{S1} > \alpha_{S2}$) e distribuição irregular da carga e polaridade dos seus aminoácidos (Fox, 1989). Um resumo da composição em aminoácidos das caseínas e carga está apresentado nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. As α -CN e a β -CN distinguem-se pelo facto de precipitarem na presença de iões Ca^{2+} , contudo existem também diferenças entre elas.

Com o aumento da concentração de Ca^{2+} , a $\alpha_{\text{S1}}\text{-CN}$ tende a agregar-se em aglomerados com tamanho inferior a 6 unidades, enquanto que a $\beta\text{-CN}$, que é mais hidrofóbica, em condições semelhantes forma agregados com cerca de 30 unidades. A $\kappa\text{-CN}$ parece ser a mais estruturada das caseínas não precipitando na presença de iões Ca^{2+} . A sua estrutura pode ser dividida em dois péptidos, nomeadamente, a para- $\kappa\text{-CN}$ e o glicomacropéptido. O primeiro péptido é composto por 105 aminoácidos e tem elevada hidrofobicidade, porém, o segundo é mais hidrofílico sendo constituído por 64 resíduos. A clivagem da $\kappa\text{-CN}$ nos seus péptidos constituintes pode ser feita pela quimosina, enzima sintetizada pelos ruminantes, que adicionada ao leite leva à formação do “coalho” pela destabilização das micelas constituindo, deste modo, a primeira etapa na formação do queijo. O glicomacropéptido é solúvel em água, pertencendo à composição do soro, enquanto que a para- $\kappa\text{-CN}$ precipita em conjunto com as restantes caseínas (Fox, 1989; Banks & Dalgleish, 1990; Creamer et al., 1998).

Tabela 1 – Composição em aminoácidos das principais caseínas em moles/moles de proteína (Banks & Dalgleish, 1990)

Aminoácidos	$\alpha_{\text{S1}}\text{-CN}$	$\alpha_{\text{S2}}\text{-CN}$	$\beta\text{-CN}$	$\kappa\text{-CN}$
Lisina	14	24	11	9
Histidina	5	3	6	3
Arginina	6	6	4	5
Ácido Aspártico ^a	15	18	9	11
Trionina	5	15	9	14
Serina ^b	16	17	16	13
Ácido Glutâmico ^c	39	40	39	27
Prolina	17	10	34	20
Glicina	9	2	5	2
Alanina	9	8	5	15
Valina	11	14	19	11
Metionina	5	4	6	2
Isoleucina	11	11	10	13
Leucina	17	13	22	8
Tirosina	10	12	4	9
Fenilalanina	8	6	9	4
Triptofano	2	2	1	1
Cisteína	0	2	0	2
Fosforina	8	11	5	1

^a Inclui asparagina; ^b Inclui fosfoserina; ^c Inclui glutamina

O conteúdo das caseínas varia entre 24-29 g/L de acordo com a raça, o período de lactação e tempo de ordenha (Southward, 1994), podendo alterar-se consoante as variantes genéticas do bovino (Walstra & Jenness, 1984). Essas variantes genéticas ou polimorfismos

foram demonstrados pela primeira vez, por electroforese, na β -Lg por ocorrência de uma substituição na sequência de aminoácidos originando uma alteração na carga da proteína. A frequência destas variantes genéticas depende, igualmente, da raça e da espécie bovina. As substituições que levam a alterações na carga da proteína são consideradas variantes genéticas e, por conseguinte, mais facilmente detectáveis. Por outro lado, substituições que não provocam alterações na carga da proteína não são detectáveis por electroforese mas não significa que não sejam comuns (Fox, 1989). A fracção proteica conhecida por γ -caseína encontra-se invariavelmente presente no leite bovino devendo-se a sua existência à proteólise pós-traducional da β -CN. A degradação desta caseína resulta na já referida γ -caseína e nas protease-peptonas do leite. Na Tabela 2 estão apresentadas as diferentes variantes genéticas das caseínas, tamanho molecular aproximado e carga eléctrica a pH 6.6.

Tabela 2 – Caseínas do leite bovino, peso molecular, suas variantes genéticas e carga (Banks & Dalgleish, 1990; Fox, 1989)

Família	Tamanho molecular aproximado (Daltons)	Variantes genéticas	Carga a pH 6.6
α_{S1} -caseína	23614	A, B, C, D	-20.9
α_{S2} -caseína	25320	A, D	-13.2 a -18 ^a
β -caseína	23983	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E	-12.3
κ -caseína	19023	A, B	-3.9
γ -caseína ^b	20500	A ¹ , A ² , A ³ , B	-
	11900	A ² , A ³ , B	-
	11600	A, B	-

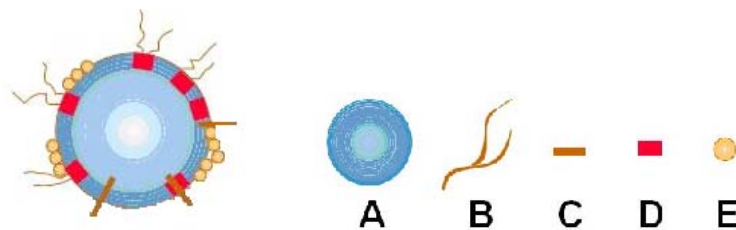
^a Varia consoante a quantidade de fósforo existente na caseína

^b Resultante da degradação da β -caseína por acção da plasmina (proteínase alcalina)

1.1.2.2. Estrutura das micelas de caseínas

No leite, aproximadamente 95% das caseínas existem na forma de complexos proteicos, denominados micelas, que consistem em aglomerados de caseínas, cálcio, fosfato inorgânico e citrato, que apesar de variarem em tamanho, acredita-se que a sua estrutura seja semelhante entre espécies (McMahon et al., 2008). As proteínas na micela estão agregadas por interacções não covalentes, surgindo numa forma muito estável (Veloso et al., 2002). As propriedades tecnológicas do leite são fortemente influenciadas pela estabilidade das micelas de caseína, conferida pela κ -CN em associação com o Ca^{2+} , o Mg^{2+} e os respectivos fosfatos (Banks & Dalgleish, 1990; Creamer et al., 1998).

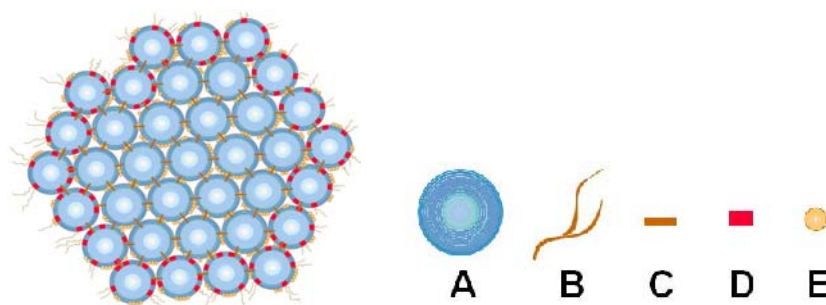
A estrutura detalhada das micelas continua a ser, de certo modo, um assunto controverso (Cucheval et al., 2009). A sua estrutura é investigada há mais de 50 anos, tendo sido propostos vários modelos e revisões ao longo dos anos (McMahon et al., 2008). As micelas de caseína são partículas com um raio médio de cerca de 100 nm, que podem conter vários milhares de moléculas de caseínas. A estrutura interna das micelas não está muito bem estabelecida (Banks & Dalgleish, 1990). Diversos são os modelos propostos para explicar a estrutura das micelas, contudo, de acordo com McMahon et al. (2008) estas não apresentam uma estrutura clássica. Um modelo mais simplista, como se pode constatar na Fig. 2, sugere que o interior da micela é hidrofóbico, composto pela α_{S1} -CN, α_{S2} -CN e β -CN, rodeadas por uma carga hidrofílica e por uma camada difusa que estabiliza a micela através do equilíbrio gerado pelo fosfato de cálcio e pela κ -CN (Banks & Dalgleish, 1990; Liu et al., 2009).



(A – submicela; B – cadeias salientes; C – fosfato de cálcio; D – κ -CN; E – grupos fosfato)

Figura 2 – Micela de caseína (modelo simplista)

Um modelo alternativo representa as micelas como um agregado de submicelas, que por sua vez estão ligadas a outras moléculas de caseínas formando um aglomerado (Fig. 3).



(A – submicela; B – cadeias salientes; C – fosfato de cálcio; D – κ -CN; E – grupos fosfato)

Figura 3 – Micela de caseína (modelo alternativo)

Nenhum dos modelos, referidos anteriormente, explica o papel do fosfato de cálcio. Estudos mais recentes têm sugerido que o fosfato de cálcio e as caseínas, nomeadamente α_{S1} -CN, α_{S2} -CN e β -CN, estão ligados pela participação dos resíduos fosfoserina na estrutura do

fosfato de cálcio tornando-se, por isso, num modelo mais aceite (Banks & Dalgleish, 1990; McMahon et al., 2008). Dado o elevado conteúdo em resíduos fosfoserina, o interior hidrófobo das micelas liga-se fortemente a catiões, principalmente ao Ca^{2+} e Mg^{2+} mas também ao Zn^{2+} . Esta ligação é, em termos nutritivos, muito importante pois leva à neutralização da carga, agregação e precipitação da micela (Fox, 1989).

McMahon et al. (2008) propuseram um novo modelo estrutural das micelas de caseína com base em resultados obtidos por microscopia de transmissão electrónica (Fig. 4). Este novo modelo engloba não só as proteínas como também agregados de fosfato de cálcio, que desempenhariam um papel fundamental durante a construção das micelas. As micelas surgem, portanto, como super-estruturas moleculares irregulares que permitem múltiplas ligações, nomeadamente, a β -CN e/ou α_{S1} -CN que participam no alongamento das cadeias de caseínas; a α_{S1} -CN e/ou α_{S2} -CN fornecem zonas de ramificação da cadeia; a κ -CN surge como terminadora das cadeias e os aglomerados de fosfato de cálcio como pontos de interligação. Na periferia da micela, algumas cadeias proteicas de κ -CN podem-se destacar individualmente ou como polímeros ligados por pontes de dissulfureto. O número destas protuberâncias de κ -CN é muito inferior ao postulado por Horne (1984).

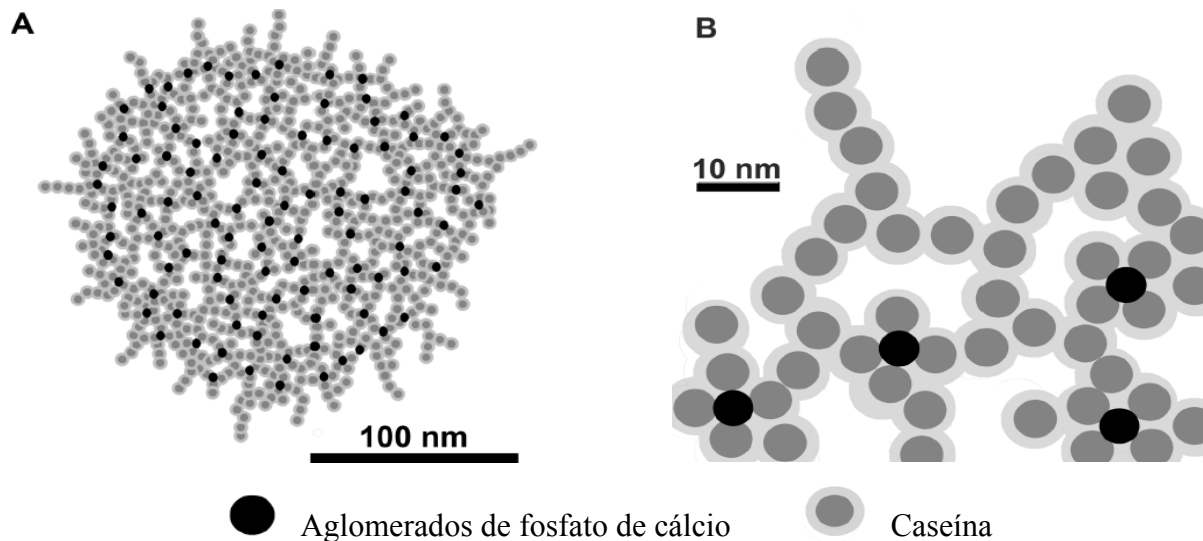


Figura 4 – Diagrama esquemático do modelo estrutural da micela de caseína proposto por McMahon et al. (2008). [A] – Visão à escala da micela de caseína. [B] – Porção da periferia da micela de caseína

Em suma, esta estrutura super-molecular produz uma partícula coloidal muito estável constituída por milhares ou dezenas de milhares de proteínas e centenas de aglomerados de fosfato de cálcio. De acordo com Smith et al. (2004), o fosfato de cálcio contabiliza cerca de 7% da massa seca das micelas sendo que quando atingem um diâmetro superior a 200 nm, e

10⁶ kDa, contêm cerca de 800 aglomerados de fosfato de cálcio. Estes números levam a uma razão de 60 moléculas de proteína por aglomerado de fosfato de cálcio.

Segundo McMahon et al. (2008), pontes de hidrogénio e outras interacções electrostáticas comuns nas proteínas poderão desempenhar um papel importante na manutenção da integridade da micela. A multiplicidade de interacções e a sua estrutura conferem às micelas de caseínas uma certa elasticidade e alguma resistência à completa dissociação caso alguma das interacções seja quebrada. É notório salientar que, ao contrário dos modelos anteriores, este modelo propõe que a introdução de qualquer factor químico, como por exemplo álcool, produz alterações globais na estrutura da micela e não apenas na sua superfície. Apesar da estrutura estável e flexível proposta por McMahon et al. (2008), inúmeros são os factores que podem destabilizar esta estrutura e que estão na génese de diversos produtos derivados do leite. No subcapítulo seguinte serão abordadas algumas das mais importantes modificações utilizadas pela indústria, bem como os produtos resultantes dessas alterações.

1.1.2.3. Modificações químicas e enzimáticas das proteínas do leite

As micelas de caseínas podem ser destabilizadas por diferentes tratamentos químicos, tais como, ácidos, solventes orgânicos (ex. etanol), calor, modificação enzimática, adição do ião Ca²⁺ ou uma combinação destes factores. A destabilização das micelas por estes factores resulta na coagulação ou gelificação do leite, sendo estas alterações utilizadas na criação de diversas gamas de produtos, nomeadamente produtos alimentares, como: o queijo, suplementos alimentares derivados de caseínas, alimentos para animais, adesivos, entre outros (Fox, 1989; Southward, 1994). Todavia, a destabilização das micelas acarreta uma série de problemas durante o processamento e armazenamento de certos produtos. Por exemplo, durante muitos anos tem sido sugerido que as proteínas do soro dissociam-se das caseínas no leite durante o armazenamento pelo calor induzido no processo de esterilização (ultrapasteurização) do leite UHT (Fox, 1989).

Como referido inicialmente, as caseínas são insolúveis a pH 4.6 a temperaturas inferiores a 20 °C. Na coagulação ácida, o pH normal do leite diminui por acção de bactérias lácticas (fermentação da lactose em ácido láctico) ou pela adição directa de ácidos, tais como, o ácido clorídrico (HCl), ou a utilização da glucono-delta-lactona (GDL) que é hidrolisada a ácido glucónico resultando na diminuição do pH (Mulvihill, 1989). Após a redução do pH origina-se um precipitado rico em caseínas que pode ser utilizado em diversos processos para

a produção de queijo. As micelas de caseínas podem ser separadas das proteínas do soro através de ultracentrifugação ou ultrafiltração, sendo o primeiro mais comum no laboratório (Fox, 1989). A secagem das caseínas pode ser utilizada na produção de: leite em pó, fórmulas para bebês, suplementos alimentares, alimentos sintéticos (ex. gelatina), gelados e sobremesas frias, “snacks”, bebidas desportivas, barras alimentares nutricionais, pequenos-almoços rápidos, produtos farmacêuticos, fibras para o sector têxtil, comida para animais, cosméticos, entre outros (Southward, 1994; Mulvihill, 1989; Hoffman et al., 2004; Pecníková et al., 2002).



Figura 5 – Produtos derivados de caseínas resultantes da precipitação ácida

A forma de destabilização das micelas de caseínas mais importante a nível tecnológico é, indubitavelmente, a provocada na κ -CN. Este fenómeno é muito utilizado no fabrico de diversas variedades de queijos e caseína rennet². A κ -CN é extremamente sensível a enzimas proteolíticas ácidas, tais como a quimosina, principal enzima presente no rennet. Enzimas deste tipo são usadas quase universalmente com a denominação de rennets. A actuação da quimosina provoca uma clivagem na ligação dos resíduos 105-106 dos aminoácidos metionina e fenilalanina da κ -CN. Após a clivagem, o glicomacropéptido constituinte da κ -CN difunde-se na fase aquosa, libertando péptidos contendo carbono, tornando-se, deste modo, altamente polar. Por conseguinte, as micelas de caseínas perdem a estabilidade resultando na sua agregação na presença do Ca^{2+} a temperaturas superiores a 20 °C (Fox, 1989).

Há muito que os investigadores defendem que o leite coagula na presença de etanol. Este destabiliza o leite pela alteração da concentração de Ca^{2+} e do pH. As caseínas são muito estáveis a temperaturas elevadas, devido à carga negativa conferida pelos grupos fosfato, desde que o pH normal do leite (aproximadamente 6.7) não se altere. Nestas condições, as

² Complexo enzimático natural, produzido no estômago dos ruminantes, muito utilizado na produção de queijo. O rennet contém diversas enzimas incluindo as enzimas proteolíticas ou proteases, pepsina e a quimosina ou renina que promovem a coagulação do leite (Fox & McSweeney., 2004).

caseínas podem ser aquecidas até 140 °C (durante 20 minutos) sem coagularem. Contudo, tornam-se menos estáveis quando se verifica um ligeiro aumento do pH para 6.9. A nível industrial estas propriedades são utilizadas para a produção do leite UHT como forma de esterilização e durabilidade do produto. De acordo com algumas pesquisas publicadas por Singh & Fox (1987), é proposto que a κ -CN dissocia-se das micelas de caseínas quando submetidas a temperaturas superiores a 90 °C e pH superior a 6.9, aumentando a sensibilidade ao Ca^{2+} e reduzindo a estabilidade ao calor. As ligações hidrófobas que desempenham um papel fundamental na associação das caseínas a baixas temperaturas ou a temperaturas ambientes, são praticamente inexistentes a temperaturas superiores a 100 °C, deste modo, verifica-se uma maior tendência para a sua agregação (Fox, 1989).

As enzimas proteolíticas ou proteases são amplamente utilizadas para provocar modificações em alimentos proteicos. Estas enzimas catalisam inúmeras reacções que incluem fosforilação, glicolização, hidroxilação, metilação e hidrólise. As enzimas proteolíticas têm sido largamente utilizadas para melhorar as funcionalidades de uma variedade de alimentos proteicos. No leite, a utilização de enzimas proteolíticas pode originar a quebra de ligações peptídicas e alterações na conformação molecular das proteínas, resultando péptidos com propriedades funcionais e tecnológicas que permitem a criação de muitos segmentos de produtos (Nakai & Li-Chan, 1989). O grande problema na utilização da proteólise em algumas proteínas (incluindo as caseínas) para o desenvolvimento e melhoramento dos produtos lácteos, é a alteração das características organolépticas dos mesmos, como por exemplo a formação de péptidos com um sabor mais amargo, particularmente durante o processo de cura dos queijos (Fox, 1989; Nakai & Li-Chan, 1989; Medeiros et al., 2009).

Capítulo 2

Alergia alimentar às proteínas do leite
bovino

As alergias alimentares têm-se tornado, ao longo dos anos, um problema de saúde, económico e social. As alergias às proteínas do leite, nomeadamente ao leite bovino, representam a causa mais comum de alergia na população infantil (Rozenfeld et al., 2002, Brill, 2008).

O leite contém mais de 50 proteínas, das quais as CN e a β -Lg estão envolvidas nas reacções imunológicas mais comuns sendo identificadas como os componentes proteicos mais alergénicos para os seres humanos (Rozenfeld et al., 2002). O factor principal que está na génese deste tipo de alergia é a introdução precoce na alimentação de substâncias que causam alterações no sistema imunitário pois devido ao facto deste estar pouco desenvolvido não possui, ainda, a capacidade de tolerar este tipo de proteínas (Rozenfeld et al., 2002; Brill, 2008). Os sintomas mais frequentes são muito semelhantes a qualquer reacção alérgica, desde erupções cutâneas, como a urticária, problemas respiratórios, gastrointestinais, entre outros. Estes sintomas podem provocar alterações no comportamento (choro, má disposição, birra, etc.) e a falta de apetite visível sobretudo em crianças (Brill, 2008). O tratamento recomendado para as alergias às proteínas do leite bovino é a sua eliminação da alimentação e/ou substituição por leites de diferentes mamíferos, fórmulas à base de soja, aminoácidos ou fórmulas com proteínas do leite parcial ou extensamente hidrolisadas. A introdução destes produtos ocorre, especialmente, em recém-nascidos que apresentam uma predisposição clínica ou que esporadicamente desenvolvem alergias ao leite bovino, quando a amamentação não é possível e/ou inadequada durante a fase de crescimento (ASSA, 1997). Acredita-se que a amamentação, ou a sua ausência, está relacionada com o desenvolvimento de doenças atópicas³. Estudos defendem que o leite materno possui um factor protector contra uma enorme variedade de distúrbios. Todavia, existe alguma controvérsia no que respeita à asma e à alergia na infância. Pesquisas recentes sugerem que a amamentação aumenta o risco de asma, doenças atópicas ou até mesmo alergias em idades mais avançadas (Elliott et al., 2008). De acordo com Elliott et al. (2008), esse aumento verifica-se somente em crianças com história familiar de doença atópica. Há indícios de que a alimentação de uma criança recém-nascida com fórmulas extensamente hidrolisadas até aos 6 meses diminui a incidência de doenças atópicas, incluindo eczema e asma (Miniello et al., 2008).

³**Doença atópica** – Predisposição genética para o desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade contra antígenos ambientais. A manifestação clínica mais comum é a rinite alérgica, dermatite atópica, asma e ocorrência de alergia alimentar (Dorlands Medical Dictionary, 2009).

2.1. Hidrolisados proteicos

Ao longo dos tempos têm-se desenvolvido fórmulas com proteínas do leite bovino parcialmente hidrolisadas, no sentido de colmatar alguns inconvenientes, como: o sabor mais amargo e o elevado custo dos produtos extensamente hidrolisados e, ainda, o facto de não estarem disponíveis de forma generalizada (ASSA, 1997). Como alternativa ao leite bovino, surgem as fórmulas com soja que são, actualmente, muito utilizadas a nível comercial. Todavia, já foram registados alguns casos de alergia à soja por 15 a 40% das crianças com intolerância às proteínas do leite bovino, além de que a soja não substitui por completo as propriedades funcionais dadas pelo leite (Curciarello et al., 2008; Potier & Tome, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que os hidrolisados proteicos do leite apresentam uma composição em aminoácidos equivalente às proteínas do leite nativo bem como uma digestibilidade igual ou superior ao mesmo (Estrada-Reyes et al., 2006).




Uma enorme diversidade de hidrolisados proteicos de leite bovino têm sido utilizados na criação de fórmulas especiais para crianças, variando na composição relativa dos aminoácidos, nas propriedades funcionais (componentes extra adicionados) e no grau de extensão da hidrólise (Tabela 3). Estas fórmulas podem ser extensamente ou parcialmente hidrolisadas consoante as modificações pretendidas e as necessidades do consumidor alvo, que deverá ser medicamente aconselhado antes de consumir estes produtos (Koletzko et al., 2005). A maioria destas fórmulas modificadas são produtos de origem farmacêutica que se encontram disponíveis no formato de leite em pó, com necessidade de prescrição médica, uma vez que são utilizados sobretudo em recém-nascidos e crianças (Rosendal & Barkholt, 2000; Pedrosa et al., 2006).

As fórmulas parcialmente hidrolisadas são tipicamente utilizadas na prevenção de alergias enquanto que as fórmulas extensivamente hidrolisadas são preferidas para tratar a alergia ao leite de vaca em crianças. As fórmulas extensamente hidrolisadas de caseínas são recomendadas como o principal substituto para o leite humano no tratamento de alergias ao leite bovino e na prevenção de doenças atópicas em crianças com elevado risco. É de referir que se deve evitar a utilização de fórmulas parcialmente hidrolisadas, principalmente à base de proteínas de soro, em crianças diagnosticadas com alergia ao leite bovino devido ao registo de algumas reacções mais severas nestas crianças, além de que algumas fórmulas contêm lactose não sendo, por isso, recomendadas a crianças intolerantes à lactose (ASSA, 1997; Miniello et al., 2008).

Tabela 3 – Fórmulas de hidrolisados proteicos. Características e valores de mercado

Produto	Descrição	Custo (€/Kg)*
	<p>Nutramigen é uma fórmula hipoalergénica, com caseínas extensamente hidrolisadas, para bebés com sensibilidade às proteínas do leite ou soja. É efectivo nas cólicas e outros sintomas relacionados com a alergia à proteína do leite.</p>	18.53 €
	<p>Pregestimil é uma fórmula hipoalergénica, com caseínas extensamente hidrolisadas, enriquecida com ferro, sem lactose e sacarose. Contém 55% de gordura na forma de triglicéridos de cadeia media, ácido araquidónico e outros nutrientes encontrados no leite materno.</p>	46.98 €
	<p>NAN-HA é uma fórmula hipoalergénica, com proteínas do soro parcialmente hidrolisadas. Contém lactose, maltodextrina, óleos vegetais, citrato de cálcio, fosfato potássio, cloreto de cálcio, citrato de sódio, cloreto de magnésio, vitaminas, cloreto de sódio, L-arginina, inositol, L-histidina, sulfato de zinco, L-carnitina, cloreto de potássio, sulfato de cobre, iodeto de potássio.</p>	21.25 €
	<p>Leite hipoalergénico com péptidos de cadeia curta, concebido para satisfazer as necessidades nutricionais de lactentes em risco de alergia. Nutribén deve ser usado apenas sob orientação do médico.</p>	45.48 €
	<p>Aptamil é uma fórmula com proteínas do soro hidrolisadas. Contém óleos vegetais, galactose e polifrutose, emulsionantes, trifosfato de cálcio, cloreto de potássio, óleo de peixe, cloreto de magnésio, carbonato de cálcio, cloridrato de colina, ácido L-ascórbico e outros componentes essenciais.</p>	20.99 €
	<p>Nutrilon é uma fórmula hidrolisada à base de albumina de soro bovino e gorduras vegetais (girassol, amendoim). Contém lactose, prébioticos, minerais, vitaminas, lecitina, selénio, L-arginina, L-histidina e β-caroteno.</p>	18.53 €

Tabela 3 (cont.)

Produto	Descrição	Custo (€/Kg)*
	Alfaré é uma fórmula especial de fácil absorção à base de proteínas de soro extensamente hidrolisadas e ultra-filtradas. Contém 40% de triglicéridos de cadeia média e é enriquecida com nucleótidos e anti-inflamatórios. É isenta de lactose e sacarose. É particularmente indicada para lactentes com diarreia aguda, intolerantes ao leite de vaca ou de soja e com história familiar de alergia.	175.78 €
	Aptamil Soja, fórmula infantil à base de proteína isolada de soja enriquecida com ferro e L-metionina. Isenta de sacarose, lactose e proteínas lácteas. Indicado para lactentes desde o nascimento até os 6 meses com intolerância à lactose ou em situações nas quais for indicado retirar o leite de vaca da dieta.	32.88 €
	Isomil é uma fórmula à base de soja para recém-nascidos com diagnóstico de alergia às proteínas do leite bovino. Está isento de lactose e contém diversos minerais, vitaminas, ácidos gordos e aminoácidos essenciais. Fórmulas especiais de Isomil possuem um enriquecimento em ómega-3 e ómega-6.	36.85 €

*Valores aproximados: Hipermercados Continente online (<http://www.continente.pt/>); Hipermercados Jumbo (<http://www.jumbo.pt/FrontOffice/ContentPages/JumboNetHome.aspx>); Associação nacional de farmácias (www.anf.pt/); Associação de farmácias brasileiras (www.abrafarma.com.br/)

2.2. Inconvenientes dos hidrolisados proteicos

Um dos problemas identificados nas fórmulas dos hidrolisados proteicos é a alteração do sabor que pode originar uma ingestão menor de leite contribuindo para o agravamento de alergias e malnutrição. As fórmulas parcialmente hidrolisadas possuem um sabor menos amargo que as extensamente hidrolisadas, por sua vez as de proteínas de soro têm um sabor mais agradável que as caseínas, devido à reduzida concentração de péptidos hidrofóbicos e de menores dimensões durante a hidrólise (Estrada-Reyes et al., 2006; Pedrosa et al., 2006). O sabor amargo depende da conformação dos péptidos pois apenas uma parte destes interage com os receptores gustativos (Fig. 6). Alguns autores referem que a fracção 193-201 da β -CN é responsável pelo gosto amargo dos hidrolisados, por outro lado, outros defendem que este sabor depende da enzima proteolítica utilizada. Com efeito, os péptidos resultantes da

hidrólise com uma exopeptidase⁴ poderão originar produtos com um sabor mais agradável (Pedrosa et al., 2006).

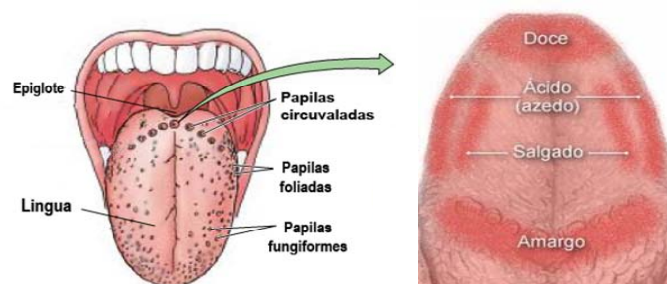


Figura 6 – Representação esquemática dos receptores gustativos

Pedrosa et al. (2006) realizaram uma análise sensorial a 50 voluntários saudáveis, do staff do Hospital Universitário de La Paz em Madrid, que se submeteram a uma prova aleatória com 12 fórmulas de leites modificados. Os parâmetros sabor, textura e aroma foram classificados numa escala de 1 (pior) a 5 (ótimo). Os resultados obtidos estão disponíveis na Tabela 4. Os autores concluíram que as fórmulas de soja são as que constituem uma melhor alternativa ao leite normal muito possivelmente devido à adição de adoçantes e agentes aromatizantes, por exemplo, a baunilha. Observa-se que o leite parcialmente hidrolisado apresenta as características organolépticas que mais se aproximam do leite normal e que os hidrolisados de proteínas do leite possuem um sabor menos agradável que os hidrolisados de origem vegetal.

Tabela 4 – Resultados do teste de palatabilidade efectuado por Pedrosa et al. (2006) a leites modificados

Fórmula	Sabor	Aroma	Textura	Total
Leite bovino convencional	4.10	3.74	4.06	11.9
Hidrólise parcial do leite	2.78	3.22	3.54	9.54
Hidrolisado parcial de proteínas do soro	1.52	2.26	2.60	6.38
Hidrolisado parcial de caseínas	1.32	2.02	2.40	5.74
Soja	2.80	2.70	2.94	8.44
Hidrolisado das proteínas de soja	2.40	2.40	2.82	7.62
Hidrolisado das proteínas de arroz	2.56	2.64	2.74	7.94

⁴**Exopeptidase** – Enzima proteolítica que actua na região terminal das cadeias peptídicas (Biassuti, 2006).

As fórmulas modificadas não fornecem necessariamente os mesmos nutrientes que o leite normal o que pode, de certa forma, influenciar o desenvolvimento normal das crianças (Estrada-Reyes et al., 2006). Não obstante, com base num estudo efectuado por Rosendal & Barkholt (2000), um número significativo de crianças com alergia às proteínas do leite bovino reage a estas fórmulas de hidrólise parcial. Através dos resultados obtidos com recurso às técnicas de filtração por gel, electroforese e ELISA⁵, verifica-se que as fórmulas parcial e extensamente hidrolisadas podem conter elementos alergénicos. De acordo com Estrada-Reyes et al. (2006) tem sido detectado que fórmulas de hidrolisados proteicos estão na origem de elevadas concentrações de ureia no soro e aminoácidos no plasma sanguíneo dado o elevado número de aminoácidos ingeridos. Também foram detectadas disfunções no fígado em indivíduos alérgicos mesmo não se verificando sintomas digestivos (Yada et al., 2008). Contudo, estudos demonstram que crianças alimentadas adequadamente com hidrolisados proteicos desde os primeiros meses de vida podem crescer e desenvolver-se de forma saudável, natural e ultrapassar as alergias com a idade, retomando a ingestão de leite normal que tem um custo muito menor que os leites modificados (Tabela 3).

Face a alguma controvérsia em torno dos benefícios das propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos, será imprescindível uma investigação mais objectiva sobre a segurança destes produtos sendo, igualmente, necessário melhorar tecnicamente os processos de produção para tornar as características organolépticas e o custo dos produtos mais aceitáveis juntos dos consumidores (Stanley et al., 1991).

⁵**ELISA** – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo (Simersky et al., 2007).

Capítulo 3

Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas ou proteases, como já mencionadas no final do capítulo 1, são fundamentais do ponto de vista económico. São ferramentas que têm sido utilizadas na medicina e na indústria há vários anos, como por exemplo, no fabrico de queijo e de cerveja, no amaciamento da carne, na produção de emulsionantes e no melhoramento das funcionalidades de uma variedade de alimentos proteicos. Catalisam ligações peptídicas nas proteínas sendo divididas em endopeptidases e exopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia. As primeiras actuam de preferência nas regiões internas da cadeia polipeptídica entre as regiões N e C-terminal, enquanto que as exopeptidases actuam somente nas regiões terminais das cadeias (Nakai & Li-Chan, 1989; Pardo et al., 2001; Barrett et al., 2004; Biasutti, 2006).

As enzimas proteolíticas são classificadas em seis grupos como se pode verificar na Tabela 5, de acordo com o respectivo aminoácido no centro activo.

Uma das maiores aplicações tradicionais das proteases na indústria alimentar é a coagulação do leite na produção e na maturação do queijo. Diversas são as enzimas proteolíticas que induzem essa coagulação, podendo estas serem de várias fontes. A importância destas proteases resulta não só da habilidade para coagular o leite mas também do grau de proteólise que a enzima é capaz de produzir. As proteases diferem nas propriedades físicas e proteolíticas e no facto de serem ou não adequadas para uma determinada aplicação industrial (Tavares et al., 1997; Pardo et al., 2001).

No fabrico de queijo, muitas são as enzimas capazes de coagular o leite, no entanto, a maior parte delas não são adequadas devido à sua acção proteolítica, à perda de gordura do coalho e desenvolvimento de alterações desagradáveis na textura e sabor durante o processo de cura (Tavares et al., 1997). Inúmeras investigações têm sido realizadas, ao longo dos anos,

Tabela 5 – Classificação das enzimas proteolíticas (Hedstrom, 2002; Barrett et al., 2004)

Classificação	Aminoácido no centro activo	Observações
Proteases de serina	Serina	Endopeptidases
Proteases de treonina	Treonina	Descritas a partir de 1995
Proteases de cisteína	Cisteína	Encontradas em frutos como papaia, kiwi e ananás
Proteases de aspartato	Aspartato	Endopeptidases
Proteases de glutamato	Glutamato	Descritas a partir de 2004
Metaloproteases	Metal zinco	Maioria são dependentes de zinco mas algumas utilizam cobalto

a diversas proteases de origem microbiana, provenientes de plantas e animais, como possíveis alternativas ao rennet no fabrico de queijos com diferentes propriedades dado a crescente dificuldade em encontrar uma enzima natural e adequada oriunda de uma única fonte. Com efeito, um estudo realizado por Tavares et al. (1997) teve como objectivo a extracção de enzimas do estômago do atum e comparar a sua actividade proteolítica com a do rennet comercial. Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de uma protease extraída do atum, como substituto do rennet, é viável em termos tecnológicos. É de referir que este é apenas um exemplo das muitas alternativas naturais que ainda não foram devidamente exploradas. Assim sendo, serão necessários mais estudos que permitam uma melhor caracterização e avaliação do potencial das proteases na transformação de alimentos.

Um estudo realizado por Giangiacomo et al. (1991) mostrou ser possível produzir um leite mais digerível aplicando um tratamento enzimático com uma protease sem que haja perda das propriedades do leite. Com efeito, é possível produzir este tipo de leite modificado, com recurso a diversas proteases, como por exemplo rennet, papaína, tripsina, bromelaína, entre outras. Na presente dissertação de mestrado fez-se um estudo sobre a escolha da protease que melhor se adequaria na confecção deste leite, em termos económicos, organolépticos e tecnológicos. De acordo com as características da bromelaína, e pelo facto de esta poder ser extraída de um subproduto da cultura do ananás dos Açores, foi escolhida para o estudo e produção deste leite modificado. De seguida, apresentam-se algumas propriedades e características desta endopeptidase.

3.1. Bromelaína

Actualmente, a maioria das proteases utilizadas nos processos industriais são de origem microbiana, sendo muitas vezes preteridas por proteases de cisteína (Pardo et al., 2001). Contudo, na década de 50 do século XX, segundo Heinicke⁶ & Gortner (1957), a rennet seria a protease mais utilizada, seguida da papaína (extraída da planta da papaia - *Carica papaya*), cuja importação para os Estados Unidos da América (EUA) oscilava entre 300 e 500 toneladas/ano. A protease ficina era igualmente usada, contudo, deixava um odor forte e por vezes desagradável. Nessa altura, os diversos estudos realizados permitiram a produção em larga escala da enzima extraída da planta do ananás (*Ananas comosus* – família Bromeliaceae), tornando-se uma alternativa viável em termos industriais e tecnológicos.

⁶**R M Heinicke** – Investigador do Departamento de Química do Instituto de Pesquisa do Ananás que, na segunda metade do século XX, contribuiu para a evolução das pesquisas sobre a bromelaína.

Heinicke acreditava que a bromelaína extraída da planta do ananás se tornaria na protease mais utilizada nos EUA nos anos seguintes. Ao longo dos anos, um grande número de diferentes componentes proteolíticos extraídos da toca, fruto e folha do ananás, têm sido alvo de grande interesse por parte de inúmeros investigadores. A esta diferente mistura de proteases, aparentemente sem nenhuma função no crescimento e desenvolvimento da planta (Pardo et al., 2001), provenientes de qualquer membro da família das Bromeliaceae, Heinicke & Gortner (1957) atribuíram o nome de bromelaína.

No estado bruto, a bromelaína, é formada por diversas enzimas e outros compostos. É uma mistura de diferentes endopeptidases de sulfidril (SH-EP), enxofre, proteínas digestivas e outras substâncias presentes em quantidades menores, como, a peroxidase, ácido fosfatase, inibidores de proteases e cálcio (Gregory, 1996; Baptista & Tavares, 2004).

De acordo com um estudo realizado por Baptista et al. (1999) a bromelaína é resistente a elevadas temperaturas, possuindo uma maior actividade proteolítica com o aumento gradual da temperatura sendo, ainda, activa a uma temperatura de 90 °C à qual a maioria das enzimas são destruídas ou desnaturadas. Não só a temperatura, como também o pH, influenciam a actividade proteolítica de muitas enzimas. Alguns estudos sugerem que o pH óptimo da actividade da bromelaína é próximo do neutro. Contudo pesquisas feitas aos componentes desta protease revelaram que alguns destes apresentam um pH óptimo entre 4.0 a 4.5, enquanto que outros possuíam um pH óptimo entre 6.5 a 7.0 (Arroyo-Reyna & Hernandez-Irana, 1995). A actividade proteolítica da bromelaína é igualmente afectada pela concentração de NaCl. O aumento da concentração deste sal provoca uma diminuição na actividade. Porém, um aumento na concentração de CaCl₂ resulta num aumento da actividade da referida protease, culminado na coagulação do leite pelo incremento na concentração do Ca²⁺ e consequente diminuição do pH (Baptista et al., 1999).

3.1.1. Propriedades terapêuticas da bromelaína

O ananás tem sido utilizado como planta medicinal em diversas culturas nativas sendo que um dos seus princípios activos, a bromelaína, já é conhecida quimicamente desde 1876. A bromelaína foi introduzida como componente terapêutico em 1957, quando Heinicke encontrou elevadas concentrações desta protease na toca do ananás (Gregory, 1996). Nos anos subsequentes, verificou-se um crescente aumento no interesse nos seus efeitos farmacológicos e fisiológicos. A bromelaína tem sido usada em diversas aplicações clínicas há mais de 45 anos. Apesar do seu mecanismo de acção não ser totalmente conhecido, a utilização da

bromelaína tem demonstrado efeitos benéficos, por exemplo, como agente anti-inflamatório em vários tratamentos, nomeadamente, artrite reumatóide, tromboflebites, hematomas, contusões de atletas, entre outros, não apresentando efeitos secundários, à excepção de possíveis reacções alérgicas que possam vir a surgir. Quando tomada oralmente, ocasiona uma acção significativa na dor e/ou no inchaço, pois reduz para metade o período de acção, quando comparada com outros tratamentos convencionais (Gregory, 1996; Baptista & Tavares, 2004). Ao longo das últimas décadas têm sido descobertos, por diversos investigadores, outros benefícios da bromelaína para a saúde, nomeadamente: propriedades anti-cancerígenas e anti-bacterianas; actuação como estimulante dos linfócitos no sistema imunitário, na melhoria da circulação sanguínea, nas patologias cardiovasculares, na redução da agregação das plaquetas sanguíneas através da sua acção inibidora ao nível da biosíntese de determinadas prostaglandinas na cascata de coagulação; aumenta a permeabilidade dos tecidos; eficaz no tratamento de hemorróidas e dores menstruais, entre outros (Heinicke & Gortner, 1957; Gregory, 1996; Baptista et al., 1999). É notório salientar que a ingestão de grandes quantidades de ananás não é o suficiente para se ter a quantidade de bromelaína extra para fins terapêuticos, visto que a maior concentração de bromelaína encontra-se no caule e na raiz da planta (toca) e não no fruto (Baptista & Tavares, 2004).

A bromelaína tem demonstrado efeitos benéficos após a ingestão de doses inferiores a 160 mg/dia. Porém, diversos investigadores defendem que os melhores resultados se verificam quando a bromelaína é administrada em doses superiores a 500 mg/dia (Gregory, 1996). De acordo com este autor, a bromelaína é facilmente absorvida quando ingerida oralmente e tem mostrado ser segura a doses elevadas durante períodos prolongados. Com efeito, esta protease constitui um suplemento seguro e eficaz (Gregory, 1996).

3.1.2. Aplicações da bromelaína na indústria

Até recentemente, a aplicação das enzimas a nível industrial era só do interesse de alguns cientistas, engenheiros e outros indivíduos envolvidos na pesquisa e desenvolvimento das mesmas. Actualmente, este facto já não se verifica dado a ampla publicidade comercial, principalmente através da televisão, da eficácia e segurança das enzimas nos diversos produtos utilizados diariamente, tais como, detergentes para uso doméstico, cosméticos, produtos farmacêuticos, entre outros. Estas enzimas podem ser utilizadas na produção de alimentos, de hidrolisados proteicos e no processamento de carnes e peixes (Uhlrig, 1998). As proteases pancreáticas são, actualmente, muito utilizadas na indústria das peles. As proteases

de animais e peptidases são igualmente aplicadas na indústria, por exemplo, a quimosina, a pepsina e a tripsina. O uso de proteases extraídas de plantas têm vindo a crescer nos últimos tempos, como é o caso da bromelaína (Uhlig, 1998).

Estudos mostram que a bromelaína pode ter diversas aplicações, sobretudo na indústria de laticínios, cosméticos e na indústria farmacêutica. Na indústria de laticínios esta enzima pode ser usada como alternativa aos coaguladores tradicionais, como o é o caso da enzima rennet visto possuir uma actividade proteolítica semelhante a esta mas com um tempo de coagulação menor. Esta diminuição do tempo de coagulação verifica-se devido à existência de uma alteração na conformação espacial, o que provoca modificações nas propriedades hidrofóbicas da superfície. A nível industrial a bromelaína, tal como a maioria das enzimas proteolíticas, pode ser utilizada para melhorar as características dos alimentos, como por exemplo, no polvo, a actuação de bromelaína permite a redução da sua textura, tornando melhor a aceitação no mercado. Alguns investigadores concluíram que a acção da polpa do ananás no tratamento enzimático das proteínas do leite bovino traz benefícios para a saúde, sobretudo para pessoas intolerantes a essas proteínas (Baptista & Tavares, 2004).

Porém, alguns autores defendem que as aplicações industriais da bromelaína são escassas e pouco compreendidas. A nível farmacológico, são inúmeras e complexas as reacções fisiológicas que a bromelaína provoca ao ser administrada, como por exemplo, após a sua ingestão, a bromelaína é detectada no soro sanguíneo com uma actividade enzimática intacta podendo, na sua forma biologicamente activa, interagir com os componentes do soro. Esta interacção não está devidamente esclarecida além de que a existência da bromelaína na corrente sanguínea, na forma activa, é ainda inexplicável. Outro exemplo que mostra a necessidade de mais investigação é reacção de hipersensibilidade à bromelaína apontada por alguns autores. A exposição a elevadas doses de bromelaína pode causar a separação das camadas da epiderme e aumentar a permeabilidade capilar e da pele, para além dos sintomas de náusea, vómitos e diarreia que posam vir a surgir (Alban et al., 1997; Bennett, 2000). A bromelaína é muito utilizada no sector alimentar e na medicina, apesar de serem necessárias mais pesquisas e estudos relativamente à sua segurança e eficácia quando administrada em seres humanos de modo a que não surjam controvérsias quanto ao seu uso e efeitos. Esta protease quando usada em preparações farmacêuticas, não constitui uma substância farmacologicamente homogénea mas sim uma mistura complexa de várias substâncias (Vanhoof & Cooreman, 1997; Devakate et al., 2009).

Capítulo 4

Propriedades funcionais dos péptidos do leite

Na década de oitenta pouco se conhecia acerca das propriedades funcionais dos péptidos resultantes da hidrólise das proteínas do leite. Apesar da sua estrutura mais simples facilitar a sua identificação, os mecanismos de acção destes péptidos no organismo eram pouco conhecidos (Nakai & Li-Chan, 1989).

Nestes últimos anos, muitos são os investigadores que têm demonstrado um enorme interesse nas proteínas do leite e nos péptidos resultantes da hidrólise das mesmas. Estes péptidos são inactivos enquanto parte integrante da proteína de origem, mas quando libertados por digestão enzimática ou bacteriana durante o processamento dos alimentos, apresentam propriedades interessantes de regulação no organismo (Wu & Ding, 2002; Korhonen, 2009). Recentemente descobriu-se que os péptidos, existentes no mercado como produtos nutracêuticos e alimentos funcionais, desempenham uma função muito importante como fonte de azoto e aminoácidos essenciais e têm demonstrado possuir funções biológicas essenciais para os organismos, como por exemplo, estimuladores do sistema imunitário, actividade antioxidante, anti-hipertensiva, anti-microbiana, anti-cancerígena, supressores do crescimento tumoral, entre outras. A actividade dos péptidos está relacionada com a composição em aminoácidos e a sua sequência, podendo alguns possuir propriedades multi-funcionais (Parodi, 2007; Saito, 2008; Korhonen, 2009; Pina & Roque, 2009). Na Fig. 7 estão representadas, esquematicamente, algumas das funções dos péptidos bioactivos e os órgãos alvo.

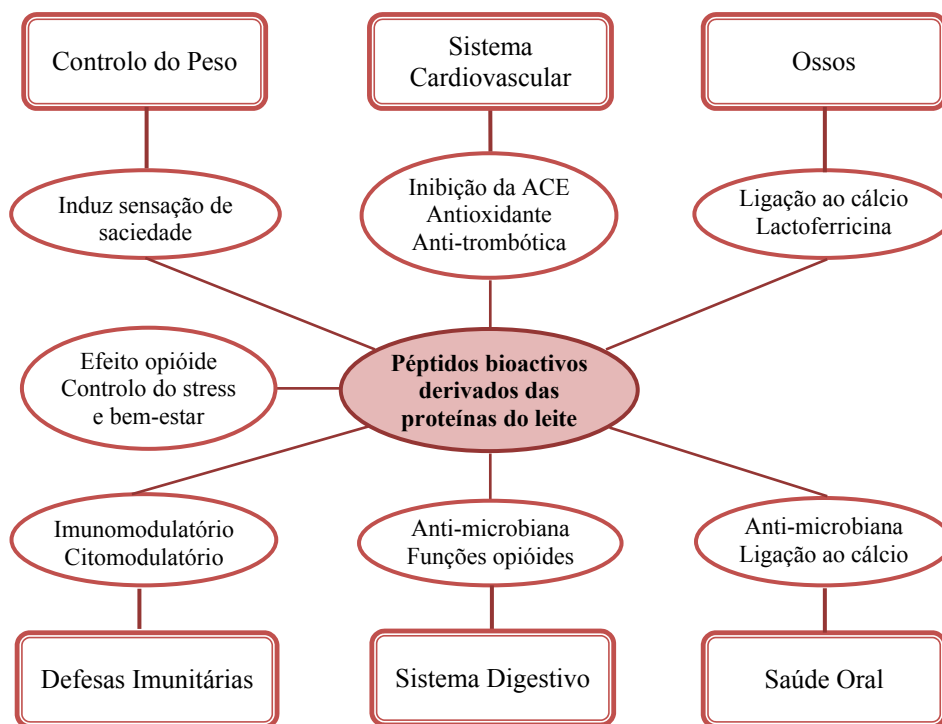


Figura 7 – Funcionalidades dos péptidos bioactivos derivados das proteínas do leite

Como forma de separar e purificar os péptidos bioactivos resultantes da hidrólise das proteínas lácteas, novas técnicas têm surgido a nível industrial como a filtração por membrana, nanofiltração ou até mesmo a ultrafiltração para a produção de novos ingredientes. Estes ingredientes estão disponíveis comercialmente sendo introduzidos em diferentes produtos, como por exemplo bebidas à base de frutas, pastilhas elásticas e cápsulas. No futuro prevê-se o desenvolvimento de produtos para o controlo de factores de risco de determinados síndromas metabólicos, nomeadamente a regulação dos níveis de lípidos no soro, o equilíbrio da glucose, entre outros. Serão necessárias mais pesquisas a nível dos péptidos bioactivos, na compreensão dos mecanismos que utilizam para exercerem as suas funções no organismo, tais como na redução do stress oxidativo pela ingestão oral de péptidos antioxidantes, na segurança e na biodisponibilidade dos mesmos. Deste modo, será igualmente importante o desenvolvimento de novas tecnologias para a conservação dos alimentos, como é o caso do micro e macroencapsulamento, e aumentar o tempo de prateleira dos produtos contendo péptidos bioactivos resultantes da hidrólise de produtos lácteos (Korhonen, 2009).

Recentemente tem-se verificado o desenvolvimento de novas tecnologias com vista à produção industrial destes péptidos bioactivos. Estes péptidos são aplicados no mercado dos produtos funcionais, quer na sua forma original, quer como enriquecimento de outros alimentos. A nível comercial, é de realçar que os produtos derivados da hidrólise de proteínas são constituídos por uma mistura de péptidos, pois de um ponto de vista tecnológico e industrial não é fácil o seu isolamento e purificação (Wu & Ding, 2002; Korhonen, 2009).

4.1. Efeito dos péptidos do leite no controlo da hipertensão

A hipertensão ou pressão sanguínea elevada constitui um dos maiores problemas de saúde pública no mundo ocidental afectando mais de 30% da população adulta em diversos países sendo que mais de 50% destes indivíduos desconhece a sua condição de hipertenso. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a hipertensão representa um factor de risco para as patologias cardiovasculares, nomeadamente, para as doenças coronárias e enfarte, disfunção renal, impotência e até morte. O risco de desenvolver doenças cardiovasculares está directamente relacionado com os níveis de pressão arterial. Por cada diminuição em 5 mm de Hg na pressão diastólica, o risco é reduzido em cerca de 16%. A hipertensão é causada por um aglomerado de factores, incluindo hereditários, ambientais, idade, massa corporal e dieta. De acordo com diversas pesquisas, a hipertensão pode ser tratada por duas vias: alterações no estilo de vida dos indivíduos ou através de medicamentos. Estudos realizados indicam que

uma dieta equilibrada rica em frutas, vegetais e produtos com baixas calorias provoca uma redução na pressão sanguínea. Os medicamentos utilizados para o controlo da hipertensão incluem diuréticos, inibidores da ACE, bloqueadores de canais cálcio, vasodilatadores, entre outros (FitzGerald et al., 2004; Platerink et al., 2008; Chen et al., 2009; Pina & Roque, 2009).

Actualmente, os produtos nutracêuticos e os alimentos funcionais, nomeadamente as proteínas do leite, têm sido alvo de um crescente interesse como potentes alternativas terapêuticas para o tratamento da hipertensão (Chen et al., 2009), através da sua actuação no RAS ao nível da angiotensina I, ACE e do receptor AT1 (Hong et al., 2008). Os péptidos derivados das proteínas de alimentos de origem vegetal (ex: soja, arroz, milho) e animal (ex: carne, peixe, ovos, leite) têm sido investigados como alternativas naturais viáveis aos medicamentos sintéticos, disponíveis comercialmente, tais como Captopril, Enalaprilat e Lisinopril. Estes medicamentos constituem potentes inibidores da ACE tendo sido desenvolvidos para o tratamento clínico da hipertensão. Apesar da influência que exercem na pressão arterial, estes medicamentos possuem efeitos secundários como tosse seca, angioedema⁷, aumento dos níveis de potássio, diminuição das funções renais e efeitos teratogénicos (FitzGerald, 2004; Guang & Phillips, 2009; Pina & Roque, 2009).

Fazendo uma comparação entre estes produtos sintéticos e os produtos contendo péptidos resultantes da hidrólise proteica de diversos alimentos, estes últimos representam uma solução natural, segura e de baixo custo para o consumidor (Guang & Phillips, 2009) face ao elevado preço a que os medicamentos sintéticos estão disponíveis comercialmente. Nos EUA a hipertensão e as complicações que advêm da mesma originaram, em 2002, 35 milhões de consultas médicas. O custo anual dos medicamentos anti-hipertensivos ronda os 15 biliões de dólares, constituindo um mercado muito atractivo para investigadores, empresas e laboratórios que tentam desenvolver soluções alternativas e exequíveis (Hong et al., 2008).



Figura 8 – Medicamentos sintéticos para o controlo da hipertensão arterial

⁷**Angioedema** – Dilatação da pele (derme), submucosa e mucosa, ocorre normalmente à volta da boca e dos olhos. Afecta mais mulheres do que homens sendo mais comum em indivíduos entre os 40 e os 50 anos de idade (Kaplan & Greaves, 2005).

De acordo com Aleixandre et al. (2008), os principais péptidos com propriedades anti-hipertensivas são derivados das proteínas do leite (caseínas e proteínas do soro). O modo mais comum de obtenção de péptidos inibidores da ACE é através da hidrólise das proteínas do leite com diferentes enzimas (mais comuns são a pepsina, tripsina e quimiotripsina), por fermentação do leite com bactérias distintas e por proteólise com enzimas derivadas de microrganismos ou plantas. A especificidade da enzima proteolítica utilizada e a optimização das condições do processo, nomeadamente o pH, a temperatura e a razão substrato:enzima influenciam a composição dos hidrolisados e, por conseguinte, a sua actividade biológica (Korhonen, 2009; Hong et al., 2008; Guang e Phillips, 2009).

4.1.1. Sistema renina-angiotensina (RAS)

A pressão sanguínea é controlada por diferentes vias bioquímicas. O seu controlo tem sido associado ao RAS, contudo este não constitui o único sistema regulador. Existem o sistema quinina-óxido nítrico (KNOS), o sistema neutro de endopeptidases e o sistema de conversão enzimática do endotélio que têm demonstrado a formação de péptidos reguladores da pressão sanguínea, independentes da ACE, do fluído e do equilíbrio electrólito através dos receptores da membrana localizados em diferentes tecidos (FitzGerald, 2004).

O RAS representa o maior sistema regulador da pressão sanguínea, do equilíbrio electrólito, renal, neuronal e funções endócrinas associadas com o controlo cardiovascular no corpo. Quando a pressão sanguínea baixa, os rins convertem a prorenina em renina pela acção da enzima “kallikrein”. A renina entra na corrente sanguínea (Fig. 9) e hidrolisa o substrato angiotensinogénio (ATN) do plasma (único substrato conhecido para a renina) levando à libertação de um decapeptido, designado angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), da porção N-terminal do ATN. Quando este péptido circula nos vasos sanguíneos é imediatamente hidrolisado num octapeptido, angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), pela ACE que promove a clivagem no dipéptido C-terminal His-Leu da angiotensina I.

A ACE também remove o dipéptido C-terminal da bradiquina (potente vasodilatador) resultando na formação de fragmentos inactivos. A angiotensina II é um potente vasoconstritor que provoca o aumento da pressão sanguínea pelo incremento do volume do fluído extracelular. Estimula a libertação da aldosterona que, por conseguinte, aumenta a retenção de água e sódio nos rins e a regeneração da renina. Interfere com o controlo da

actividade da hormona gonadotrófica⁸ e glândula pituitária (FitzGerald, 2004; Chen et al., 2009; Guang & Phillips, 2009).

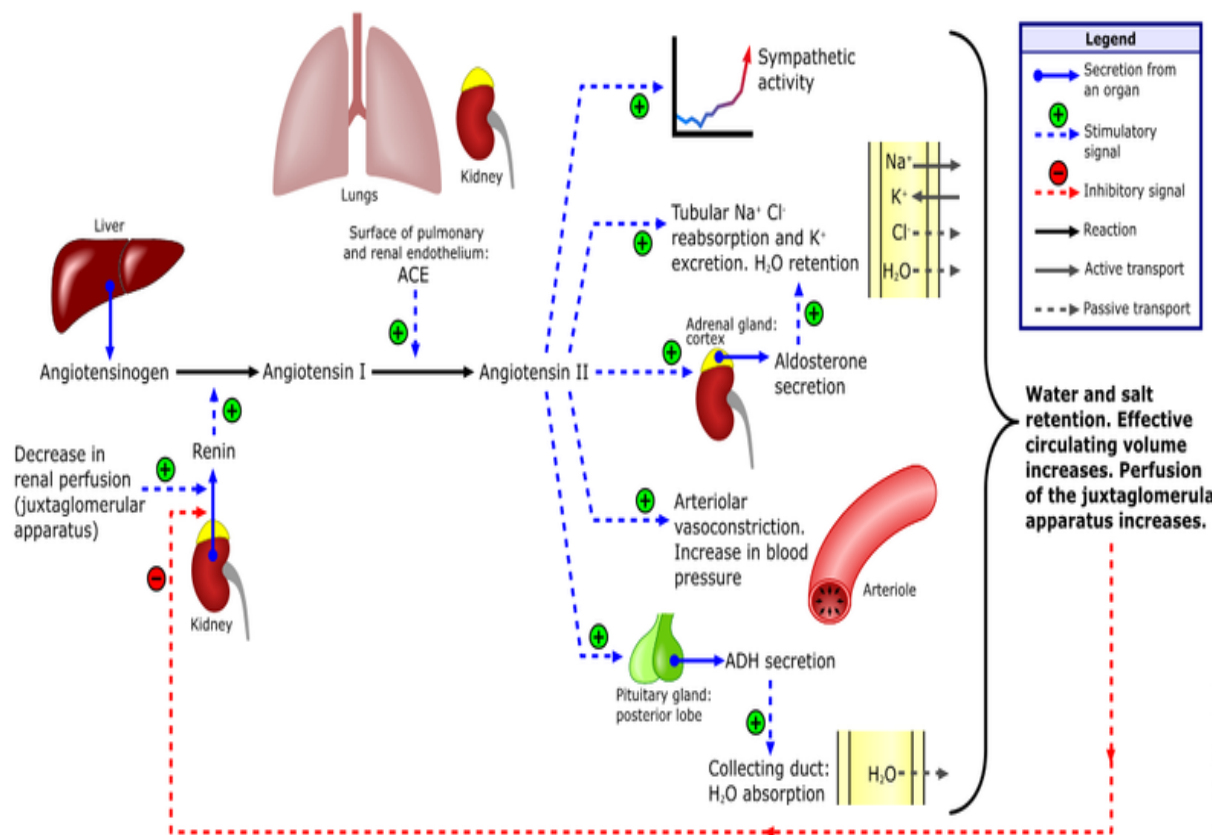


Figura 9 – Sistema renina-angiotensina (RAS)

A ACE é uma metalopeptidase de zinco distribuída pelo endotélio vascular, epitélio absorptivo, neuroepitélio e células germinativas masculinas. Actua em vários substratos como endo e exopeptidase (Pina & Roque, 2009). A angiotensina II pode ser formada a partir da angiotensina I pela enzima quimase em determinadas condições patológicas. Após a sua activação, esta enzima pode formar angiotensina II nas artérias danificadas ou arteroscloróticas (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Actuando ao nível RAS, os péptidos oriundos de proteínas podem constituir uma forma segura e económica para o tratamento da hipertensão. Futuras pesquisas na biodisponibilidade destes péptidos podem levar ao desenvolvimento de novos alimentos e medicamentos que representarão, certamente, novas alternativas para a terapia da hipertensão (Hong et al., 2008).

⁸**Hormona gonadotrófica** – Hormona libertada pela glândula pituitária anterior e placenta, estimula as gónadas e controla a actividade reprodutora (Bennett & Whitehead, 1983).

4.2. Acção inibitória dos péptidos do leite na enzima conversora da angiotensina (ACE)

Sendo a hipertensão uma doença crónica, que afecta um número significativo de pessoas, tem suscitado por parte de investigadores um grande interesse na criação de alternativas naturais viáveis para o controlo da hipertensão, actuando ao nível da ACE. Contudo, o modo exacto de interacção com a ACE não é bem conhecido, sendo principalmente suportado por informações derivadas de testes *in vivo* e *in vitro* (Chen et al., 2009; Pina & Roque, 2009). De acordo com Hong et al. (2008), a acção inibitória da ACE por péptidos depende sobretudo da especificidade estrutural de cada um. A acção dos péptidos é fortemente influenciada pelos aminoácidos que constituem a região C-terminal. Com efeito, vários estudos têm surgido com o intuito de averiguar a actividade dos péptidos, verificando-se que as sequências contendo aminoácidos hidrófobos, resíduos de prolina e/ou resíduos de lisina/arginina no C-terminal são potentes inibidores da ACE e resistentes à degradação por enzimas digestivas. Na maioria dos casos as sequências formadas unicamente por três péptidos são mais potentes do que os dipéptidos. Ambos actuam, na sua maioria, como substratos competitivos para a ACE. Estes substratos inibidores possuem a capacidade de entrar na molécula de ACE, interagir com o centro activo e impedir a ligação da angiotensina I aumentando, assim, o número de substratos disponíveis sobre os quais a enzima pode actuar (Wu & Ding, 2002). Alguns investigadores têm sugerido que os péptidos inibidores da ACE podem exercer um efeito adicional pela inibição da enzima quimase (Hong et al., 2008).

4.3. Estudos *in vitro* e *in vivo* das propriedades dos péptidos do leite

Um estudo efectuado por Sekiya et al. (1992) foi dos primeiros que descreve a produção de péptidos anti-hipertensivos derivados das proteínas do leite *in vivo*. Estes investigadores demonstraram que o consumo de 20 g/dia durante 4 semanas de leite com caseínas hidrolisadas com a enzima tripsina levava a uma diminuição da pressão arterial, diastólica e sistólica, em pacientes hipertensos. Este produto é comercializado no Japão com a designação de “Casein DP”. Na Holanda uma fórmula idêntica é comercializada com o nome de “C12 Peptide”. Os hidrolisados de proteínas do soro (disponíveis nos EUA como “Biozate”) também mostraram efeitos benéficos no controlo da pressão arterial e na redução dos níveis de colesterol LDL (Aleixandre et al., 2008; Pina & Roque, 2009).

Um aspecto fundamental a ter presente quando se efectuam ensaios com os péptidos inibidores da ACE é o facto de estes terem que resistir às enzimas proteolíticas digestivas, à

absorção através do tracto digestivo e às peptidases do soro, que constituem as principais barreiras do organismo onde os péptidos podem ser activados ou inactivados aquando da sua passagem pelo intestino (Quirós et al., 2009). Muitos estudos *in vitro* são realizados com o intuito de testar a estabilidade destes péptidos à passagem pelo intestino e o seu transporte posterior pelas células intestinais. Segundo FitzGerald et al. (2004), muitos péptidos potentes inibidores da ACE *in vitro* mostraram não possuir nenhum efeito hipotensor *in vivo* e vice versa, muito possivelmente devido à sua degradação durante a ingestão oral. Os estudos *in vitro* facultam muita informação útil, contudo é só através de estudos *in vivo* que se obtém informação credível e viável sobre o efeito hipotensivo dos péptidos resultantes das hidrólises com vista a uma possível aplicação em produtos e posterior comercialização dos mesmos. Estes estudos também podem ser muito úteis na detecção de efeitos tóxicos, carcinogénicos e teratogénicos.

Actualmente têm surgido no mercado novos produtos em que a hidrólise é cada vez mais optimizada para a obtenção de péptidos com actividade anti-hipertensiva. São usadas combinações de bactérias fermentadoras com enzimas digestivas (ex: pepsina, tripsina), observando-se a libertação de péptidos inibidores da ACE, péptidos que se ligam ao cálcio, com actividade antioxidante e antibacteriana. Os produtos “Flora/Becel pro-active” e “Evolus” são bons exemplos desta optimização (FitzGerald et al., 2004; Aleixandre et al., 2008; Guang & Phillips, 2009; Korhonen, 2009; Pina & Roque, 2009). Segundo Nakamura et al. (1995), os péptidos responsáveis pela actividade anti-hipertensiva, no leite fermentado, são as sequências VPP (Val-Pro-Pro) e IPP (Ile-Pro-Pro) importantes para o controlo da homeostasia cardiovascular pela inibição da ACE, com valores de IC₅₀ de 9 µmol/L e 5 µmol/L, respectivamente (Aleixandre et al., 2008; Pina & Roque, 2009; Jiang et al., 2010). De acordo com FitzGerald et al. (2004), a α_{S1}-CN constitui um potente inibidor da ACE *in vitro* apresentando um valor de IC₅₀ de 2,0 µmol/L seguida da BSA com 3,0 µmol/L. Na Tabela 6 encontra-se uma síntese de algumas sequências de péptidos das proteínas do leite com actividade anti-hipertensiva e inibidora da ACE. No Anexo 1 é apresentada uma tabela com todos os aminoácidos bem como as suas abreviaturas para uma melhor compreensão da informação existente na Tabela 6 e no Anexo 2 onde se apresenta de forma mais detalhada os péptidos derivados das proteínas do leite já identificados com potencial de inibição (IC₅₀) inferior a 1000 µM.

Tabela 6 – Péptidos obtidos de proteínas lácteas com actividade anti-hipertensiva (Aleixandre et al., 2008)

Sequência	Origem	Enzima	Actividade Biológica
VPP, IPP	β -CN	Proteinase de <i>Lactobacillus helveticus</i>	IACE/Anti-hipertensiva
VYP, VYPFPG		Proteinase K	Anti-hipertensiva
KVLPVP, KVLPVPQ		Proteinase de <i>L. helveticus</i>	
LHLPLP		Proteinase de <i>Enterococcus faecalis</i>	IACE/Anti-hipertensiva
FFVAPFPEVFGK	α_{s1} -CN	Tripsina	
ALPMPHIR	β -Lg	Termolisina	
LLF, LKQW		Várias enzimas	
IPA			
YGLF	α -Lg		Anti-hipertensiva

IACE – Inibidor da enzima conversora da angiotensina I. As abreviaturas dos aminoácidos encontram-se discriminadas no Anexo 1

Materiais e Metodologias

As amostras de leite bovino açoriano utilizadas para a realização deste trabalho experimental, nomeadamente, leite ultra-pasteurizado (UHT) magro e meio gordo e leite meio gordo termizado (leite cru desnatado), foram gentilmente cedidas pela fábrica Unileite (União das Cooperativas Agrícolas de Lacticínios e de Produtores de Leite da ilha de S. Miguel), as quais foram retiradas em diferentes etapas do processamento industrial indicado no fluxograma abaixo (Fig. 10).

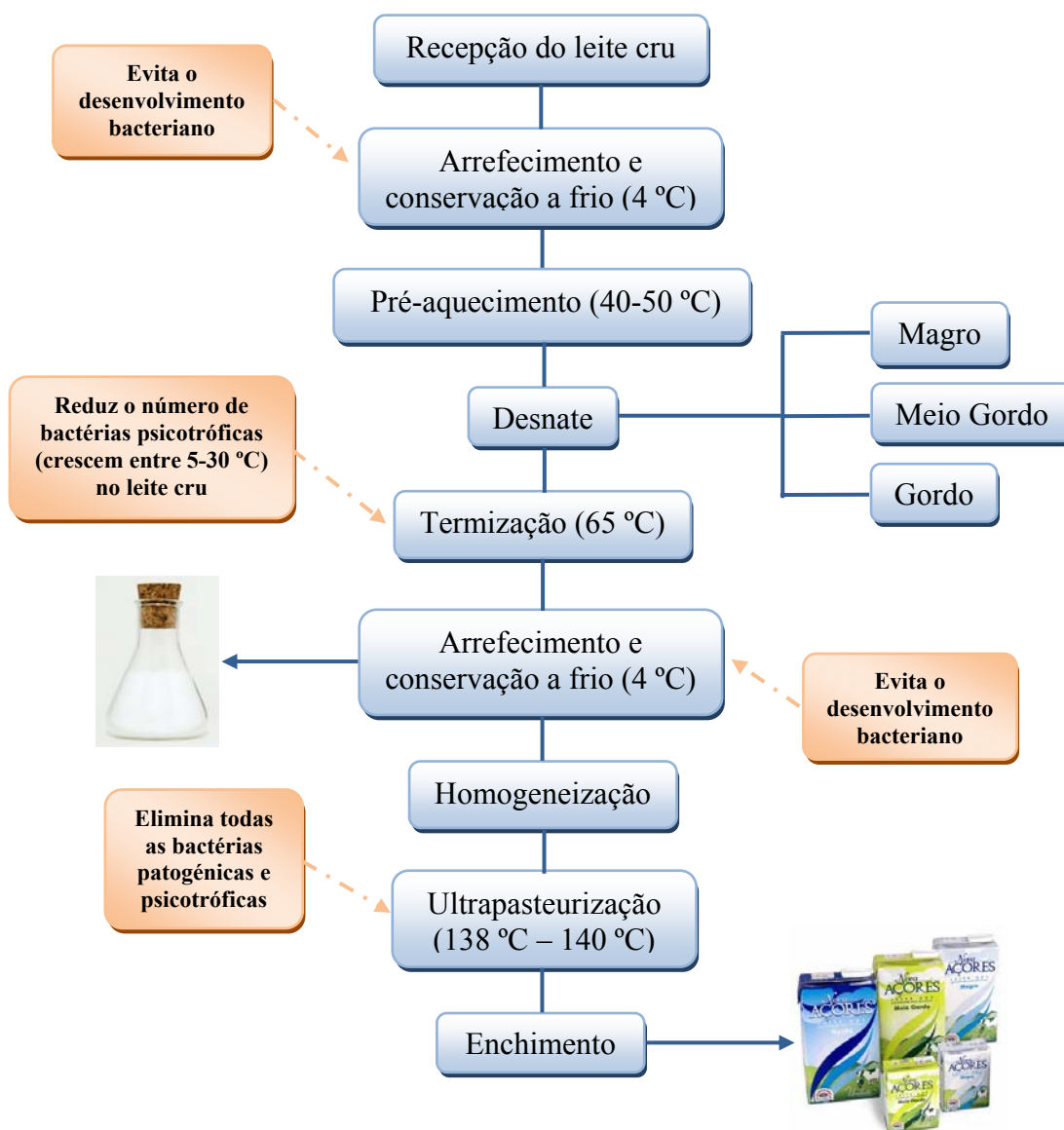


Figura 10 – Diagrama síntese do fluxograma da produção do leite na fábrica Unileite

A Unileite é uma unidade fabril que se situa na freguesia dos Arrifes no concelho de Ponta Delgada (Fig. 11). A principal actividade desta freguesia é a agricultura representando, deste modo, a maior bacia leiteira do arquipélago dos Açores dado a qualidade e abundância das suas pastagens.

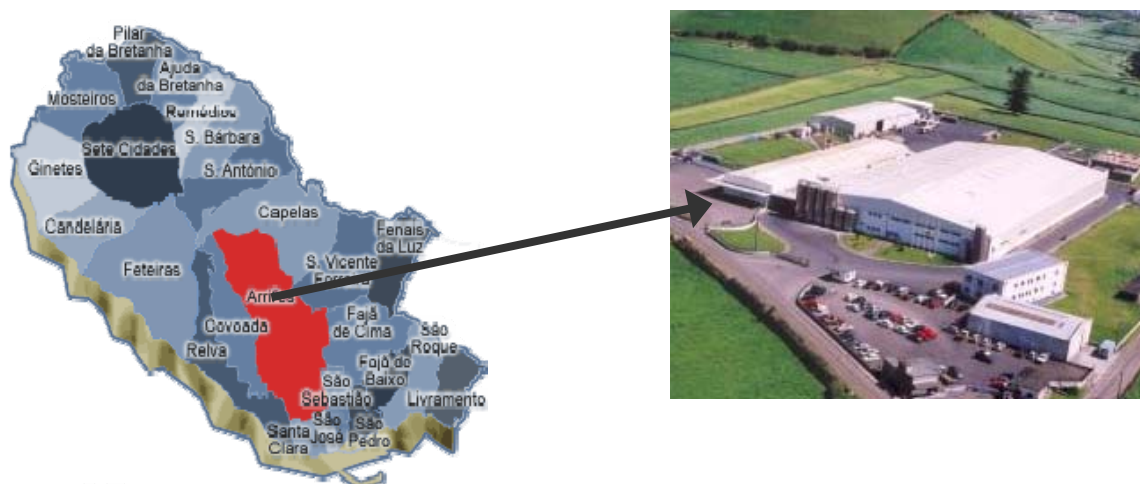


Figura 11 – Unileite - situada na freguesia dos Arrifes, concelho de Ponta Delgada

A Unileite foi constituída em 1954 na época em que a lavoura micaelense estava em crise. A sua criação teve como objectivo o desenvolvimento de uma estrutura transformadora do produto das suas explorações (o leite) que lhes conferisse uma menor dependência das empresas não pertencentes aos produtores e uma mais-valia superior à que já existia. Localizada no coração da maior bacia leiteira dos Açores e direccionada para o aproveitamento das condições naturais de excelência da região, a Unileite apostou na preservação das condições naturais do leite e das pastagens e, juntando a tecnologia avançada que dispõe, procura oferecer ao consumidor produtos lácteos diversos e de excelente qualidade. Anualmente, a unidade fabril processa 132 milhões de litros de leite, representando cerca de 40% do leite produzido na ilha de S. Miguel e 26% do total da produção regional (Unileite, 2009).

5.1. Preparação das amostras

As amostras de leite bovino foram entregues num frasco esterilizado a uma temperatura de 4° C, no caso de leite termizado, e na forma empacotada, no leite UHT. O leite termizado foi, posteriormente, guardado no frigorífico de modo a evitar eventuais alterações bacterianas que pudessem influenciar os resultados. O leite UHT empacotado foi guardado à temperatura ambiente até ser utilizado, sendo depois conservado no frigorífico a uma temperatura de 7 °C.

5.1.1. Leite meio gordo termizado

O leite termizado, que consiste em leite cru desnatado sujeito a um pré-aquecimento de 65 °C durante 15 segundos, foi sujeito a uma temperatura inicial, durante um determinado período de tempo, de modo a desnaturar parcialmente as proteínas para facilitar a actuação da bromelaína no leite. As temperaturas e o tempo utilizados encontram-se descritos na Tabela 7. Após o aquecimento do leite num recipiente esterilizado, as amostras foram arrefecidas sendo depois a bromelaína incubada aos 30 °C e inactivada aos 75 °C, como se pode observar na Fig. 12. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente, depois centrifugadas e injectadas no HPLC.

Tabela 7 – Temperatura, tempo e proporção substrato:enzima (S:E) utilizados no aquecimento inicial das amostras de leite termizado

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Proporção S:E (mL/mg)*
60	30	100:1
65	30	100:1
70	30	100:0,5
75	15	100:0,5
80	4	100:0,5

*100 mL de leite meio gordo termizado (substrato) + x mg de bromelaína (enzima)

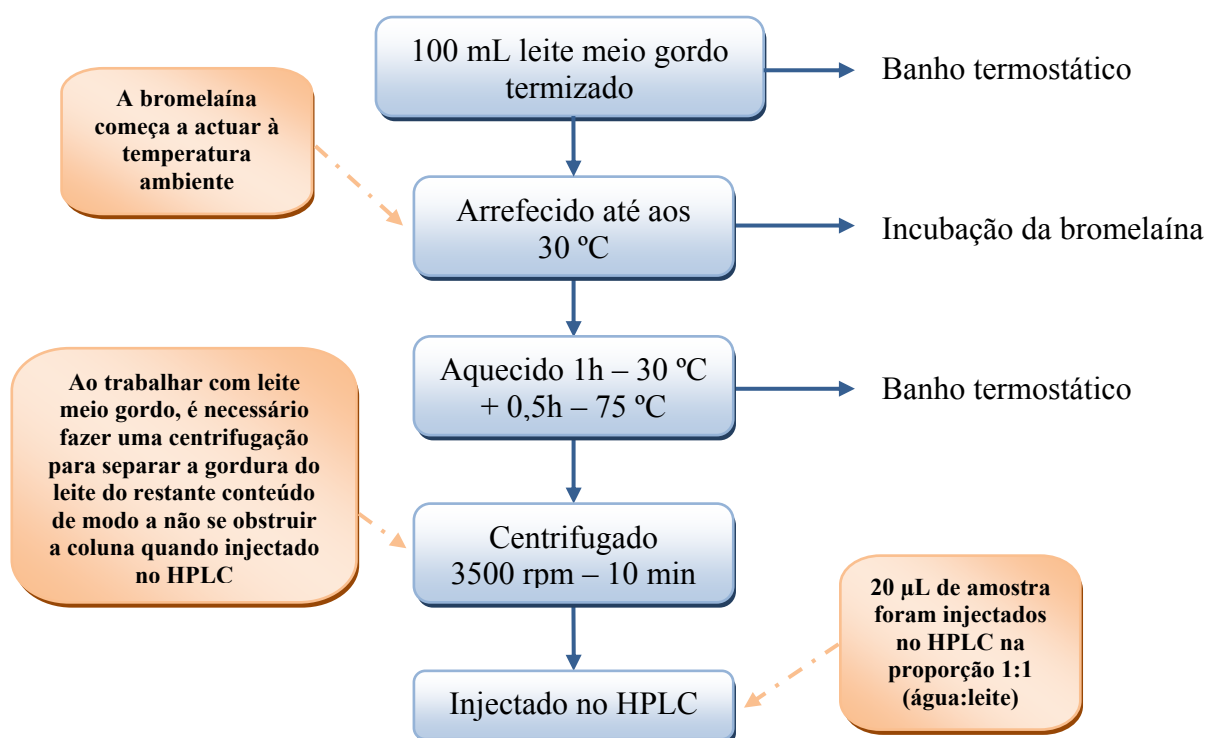


Figura 12 – Procedimento utilizado para a preparação das amostras de leite termizado

5.1.2. Leite magro e meio gordo UHT

Ao contrário do leite termizado, o leite UHT não necessita de aquecimento inicial pois dado a elevada temperatura a que foi sujeito para a ultrapasteurização, as suas proteínas já estão parcialmente desnaturadas o que facilita a acção posterior da enzima no leite.

Foram preparadas amostras de leite UHT magro e meio gordo, de modo a comparar o grau de hidrólise em cada tipo de leite, utilizando diferentes razões S:E, nomeadamente, 200:0, 200:1, 150:1, 100:1, 75:1 e 65:1. O processo utilizado para o leite UHT foi semelhante ao do leite termizado, excepto a temperatura inicial. Uma pequena quantidade de leite foi retirada do pacote e colocada num recipiente esterilizado. Em seguida, incubou-se as amostras a 30 °C durante 1h, sendo a enzima posteriormente inactivada aos 75 °C, seguindo o processo descrito na Fig 13.

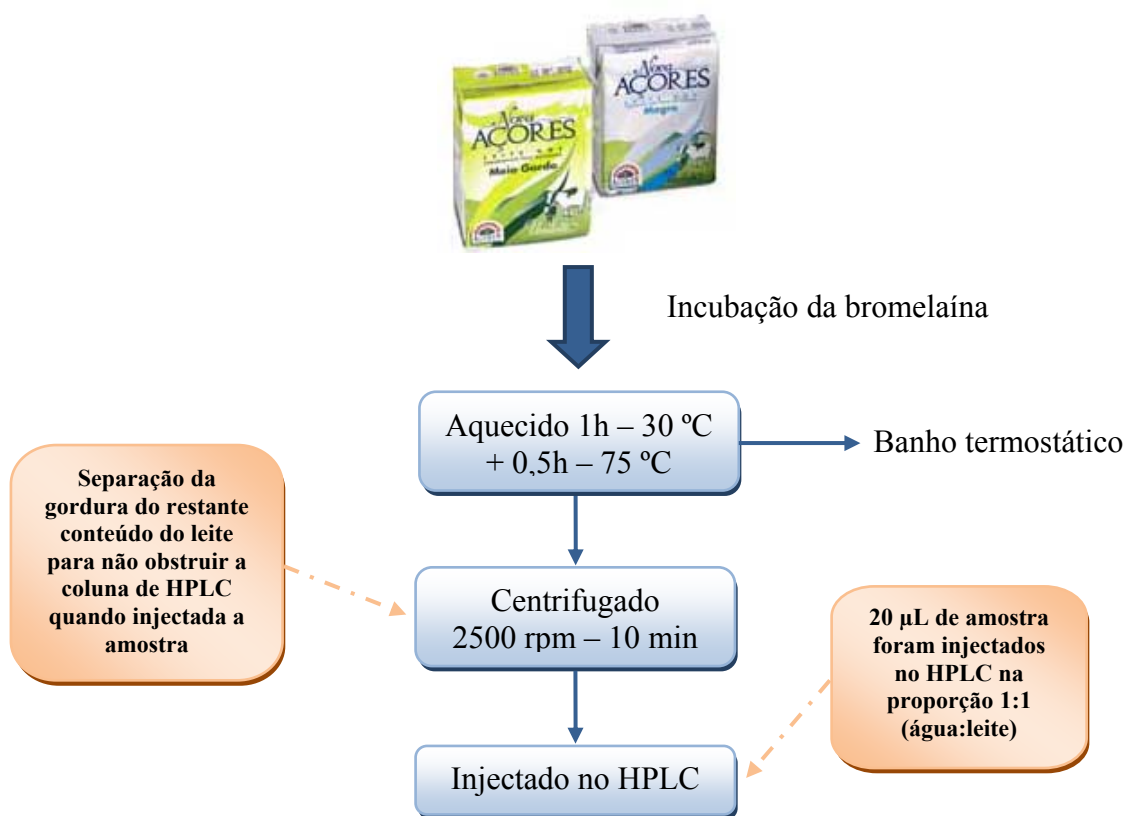


Figura 13 – Procedimento utilizado para a preparação das amostras de leite UHT

5.2. Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados na realização deste trabalho experimental encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Reagentes utilizados, grau de pureza e origem

Reagentes	Grau de pureza	Origem
ACN	Chromasolv 99,9%	Riedel-de-Haën, Germany
Cloreto de sódio	99,8%	
Cloreto de zinco	98%	
TFA	-	Sigma-Aldrich Chemicals
MeOH	Chromasolv 99,9%	
Trizma	99,9% (Titulação)	
N-Hipuril-His-Leu hidratado	98% (HPLC)	
Ácido hipúrico	99%	
HCl	37%	
Enalapril sal maleato	98% (TLC)	
Pancreatina (pâncreas de suíno)	-	
Pepsina (mucosa gástrica de suíno)	-	
ACE	10 U/mg proteína (Bradford)	
Bromelaína da toca de ananás	35% de proteína (Biureto)	
Água desionizada	-	Millipore, Bedford, USA

5.3. Metodologias utilizadas

5.3.1. HPLC das fracções proteicas do leite bovino

A separação e quantificação das fracções proteicas do leite bovino foi efectuada por HPLC, modelo 500 da PerkinElmer (Fig. 14), utilizando uma coluna de fase reversa (RP) Vydac Protein-C4 5 µm (250 x 4,6 mm d.i.).

Condições experimentais:

Fase móvel

A – 0,1% de TFA em água desionizada

B – 0,1% de TFA em ACN

Gradiente – início A:B 70:30 (v/v) seguido por um gradiente linear atingindo A:B 50:50 (v/v) durante 60 minutos e A:B 30:70 (v/v) ao fim de 70 minutos

Fluxo – 1 mL/min

Detector – UV (220 nm)

Volume da injeccção – 20 µL



Figura 14 – HPLC utilizado na análise das amostras de leite

5.3.2. Diálise das amostras de leite bovino UHT

As amostras de leite bovino UHT, previamente preparadas de acordo com o descrito na Fig. 13 do ponto 5.1.2 desta secção, foram submetidas a uma ultrafiltração por membrana com discos de celulose regenerados (Millipore Co., Billerica, MA) sucessivamente com 10 kDa e depois com 3 kDa de peso molecular (Fig. 15). Deste modo para cada amostra obtiveram-se três fracções: proteínas e péptidos com tamanho superior a 10 kDa, entre 10–3 kDa e péptidos com tamanho inferior a 3 kDa. Esta ultrafiltração por membrana permite separar os péptidos por tamanhos moleculares, com o objectivo de analisar que fracções apresentam maior percentagem de inibição da ACE. Posteriormente, as fracções foram liofilizadas⁹ num sistema de liofilização composto por um condensador (RCT 60, Jouan), bomba de vácuo (Vacuubrand, VAP 5) e uma câmara de liofilização.



Figura 15 – Célula de diálise

5.3.3. Análise do efeito anti-hipertensivo do leite modificado pela inibição da ACE

O efeito anti-hipertensivo “*in vitro*” das amostras do leite modificado (sem e após diálise), foi testado no sistema renina-angiotensina, de acordo com o protocolo sugerido pela Sigma-Aldrich Chemicals (2009), para a ACE extraída do rim de suínos (ref. A2580) e com as condições de análise por HPLC adiante descritas. As amostras (25 mg/mL) foram dissolvidas em solução tampão (100 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl e 10 μ M de ZnCl₂) a 37 °C e com pH de 8,3. A 50 μ L de amostra foram adicionados 10 μ L de solução enzimática a 0.3 U/mL e 40 μ L de solução de substrato HHL a 12,5 mM. A solução resultante foi posteriormente incubada e analisada por HPLC, conforme apresentado na Fig. 16. A análise por HPLC foi efectuada num sistema Hewlet Packard modelo Ti series 1050, utilizando uma coluna RP Adorbosphere C18 5 μ m (250 x 4,6 mm d.i.).

Condições experimentais:

Fase móvel – 14% ACN + 14% MeOH + 72% água desionizada, contendo 0,1% de HCl

Fluxo – 0,5 mL/min

Detector – UV (228 nm)

Volume da injeção – 10 μ L

⁹**Liofilização** ou criodessecação consiste num processo em que toda a água e outros solventes são removidos do produto congelado pelo processo de sublimação (Infopédia, 2010).

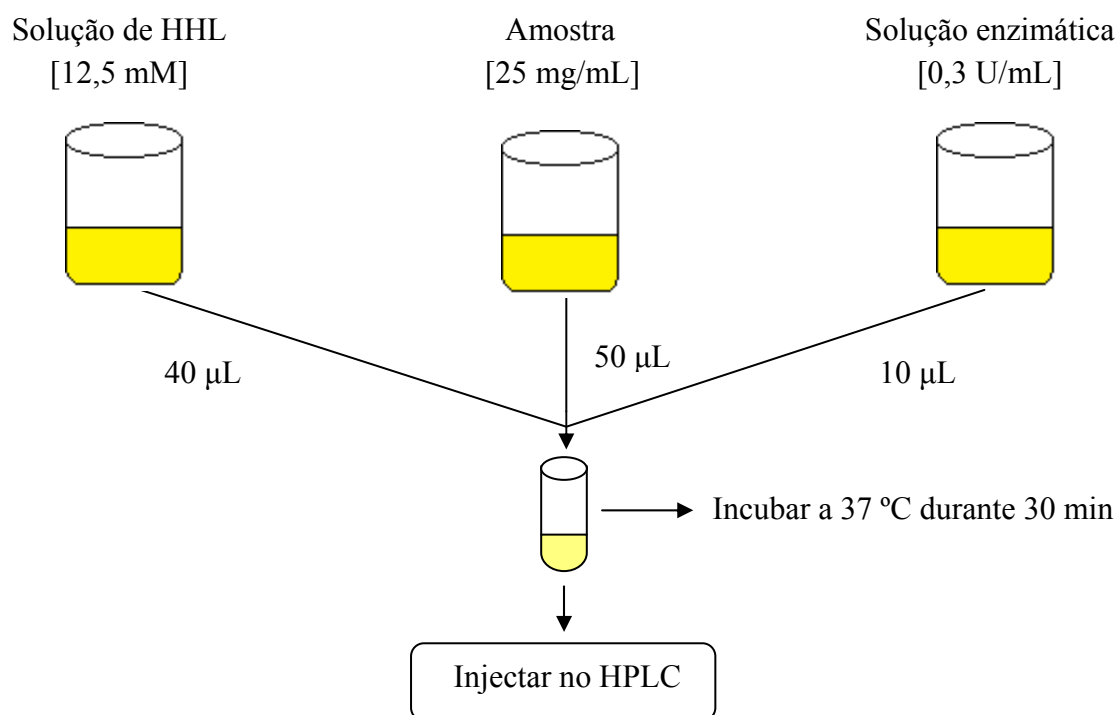


Figura 16 – Procedimento utilizado para a verificação das propriedades anti-hipertensivas do leite modificado

5.3.4. Determinação da velocidade máxima da ACE

Para o cálculo da velocidade da reacção, o substrato HHL a uma concentração de 5 mM foi incubado com a enzima ACE e com a solução tampão, em substituição da amostra, a 37 °C e com o pH ajustado para 8,3. Injectou-se no HPLC 10 µL da solução contendo a reacção com diferentes intervalos de análise: 0, 15, 30 e 45 minutos, eluída numa solução contendo ACN:MeOH:H₂O com 0,1% de HCl (condições de análise descritas no ponto 5.3.3). A velocidade da reacção foi determinada pela formação do HA, resultante da hidrólise do HHL, ao longo do tempo. Uma solução de HA (1,12 mM) foi injectada primeiramente como referência, seguindo-se as diluições sugeridas pelo protocolo da Sigma Aldrich Chemicals (2009), para a construção da curva de calibração do HA utilizando a área dos picos *versus* a concentração do HA. A actividade inibidora das amostras de leite bovino com caseínas parcialmente hidrolisadas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição da ACE} = \frac{[\text{HA}]_{\text{controlo}} - [\text{HA}]_{\text{amostra}}}{[\text{HA}]_{\text{controlo}}} \times 100$$

5.3.5. Determinação do tipo de inibição

Diferentes concentrações finais de substrato HHL (5, 2,5, 1,25 e 0,625 mM) foram incubadas com enzima ACE (0,3 U/mL) na presença de uma solução com 25 mg/mL de amostra de leite parcialmente hidrolisado com bromelaína e uma solução, com a mesma concentração, de leite sem bromelaína (controlo). A amostra e o respectivo controlo seguiram o mesmo procedimento descrito na Fig. 16 e as condições de análise referidas no ponto 5.3.3. As concentrações das amostras foram determinadas de acordo com os requisitos necessários para a elaboração de uma curva de Lineweaver-Burk sendo depois calculados os valores dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$. A curva de Lineweaver-Burk foi analisada no programa informático GraphPad Prism (versão 5.00). Os parâmetros cinéticos mencionados anteriormente foram calculados no programa Hyper 32 (versão 1.0.0) Hyperbolic Regression Analyses of Enzyme Kinetics Data.

5.4. Análise sensorial ao leite meio gordo UHT modificado

O leite meio gordo modificado, resultante da hidrólise parcial das proteínas do leite bovino com uma enzima proteolítica, a bromelaína (denominado por “**bromilac**”), foi submetido a um teste sensorial comparação-par com o intuito de averiguar as características organolépticas (cor, aroma e sabor) do mesmo, relativamente a uma amostra de leite meio gordo convencional.

O painel sensorial foi constituído por um grupo de 28 indivíduos voluntários que aceitaram participar neste teste de análise sabendo, previamente, que iriam testar dois produtos lácteos mas desconhecendo o seu conteúdo. Os provadores efectuaram o teste em cabines individuais – na sala de análise sensorial (Fig. 17) do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD) – acompanhados de um formulário anónimo (Anexo 3) com perguntas pré-definidas e de resposta qualitativa para a determinação dos resultados. Em cada cabine havia dois copos de plástico, marcados com as respectivas amostras a analisar, de acordo com a Fig. 18, e um copo de plástico para a água que era ingerida entre cada amostra.



Figura 17 – Cabines de provas (DCTD)

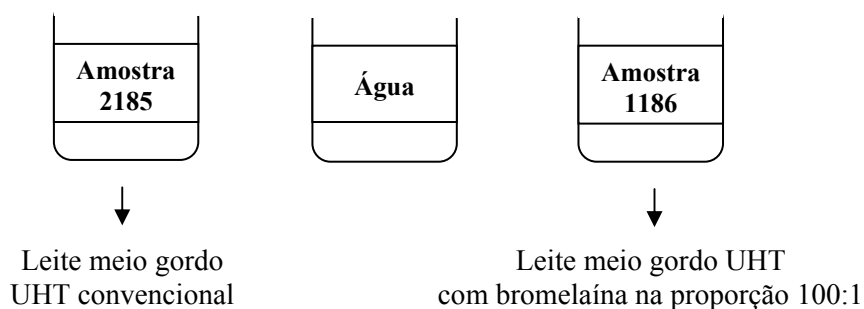


Figura 18 – Representação esquemática da composição das amostras na cabine de prova

As amostras foram fornecidas de forma aleatória e com uma designação codificada com quatro algarismos de forma manter o anonimato do produto em causa e não influenciar a decisão dos membros do painel. Após a prova das amostras de leite e o preenchimento dos formulários, procedeu-se à recolha dos mesmos sendo os resultados analisados no programa informático Excel. Os resultados do teste sensorial ao leite com bromelaína são apresentados na secção “Resultados e Discussão”.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nesta dissertação de mestrado serão apresentados e comentados de seguida. Estes serão divididos em quatro tópicos de acordo com os objectivos do trabalho. O primeiro incidirá sobre a escolha da melhor enzima proteolítica a utilizar para a degradação parcial das proteínas do leite bovino. No segundo tópico será demonstrado que a criação de um leite mais digerível é possível, partindo de diferentes tipos de leite, nomeadamente, leite UHT (magro e meio gordo) e leite termizado (leite cru desnatado), com vista a uma possível aplicação industrial. No terceiro tópico pretende-se mostrar as propriedades anti-hipertensivas *in vitro* resultantes da modificação do leite através da inibição da ACE pelas amostras testadas. Finalmente, no quarto e último tópico serão apresentados os resultados da análise sensorial feita ao leite meio gordo UHT modificado por um painel composto por vinte e oito indivíduos voluntários.

6.1. Escolha da enzima proteolítica

Este trabalho iniciou-se com a pesquisa sobre a melhor protease de entre quatro enzimas existentes no Laboratório de Tecnologia Alimentar da Universidade dos Açores, nomeadamente rennet, tripsina, pepsina e bromelaína. Estas foram utilizadas na hidrólise parcial das proteínas do leite bovino, na proporção S:E 150:1, e avaliadas mediante a sua actividade proteolítica, custo, características organolépticas e propriedades tecnológicas que melhor se adequariam à produção de um leite modificado.

Após o estudo efectuado às enzimas proteolíticas referidas anteriormente concluiu-se que a bromelaína seria a melhor opção quer devido à relação custo/capacidade proteolítica, calculada a partir da razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos/caseínas (R) apresentada na Fig. 19, quer sobretudo por não modificar o sabor do leite UHT convencional. Por outro lado, este trabalho surge no seguimento de trabalhos anteriores realizados pelos Professores Doutores José Baptista e Joaquim Ponte Tavares sobre a extracção, purificação e actividade proteolítica da bromelaína extraída do ananás açoriano (Baptista & Tavares, 1999), nos quais constataram que a bromelaína hidrolisa péptidos menos hidrófobos e com menor peso molecular que a enzima tripsina. A bromelaína é activa a elevadas temperaturas, característica que a torna única em termos tecnológicos ao contrário de outras enzimas utilizadas na indústria que são menos activas (ex. rennet) ou até mesmo inactivas.

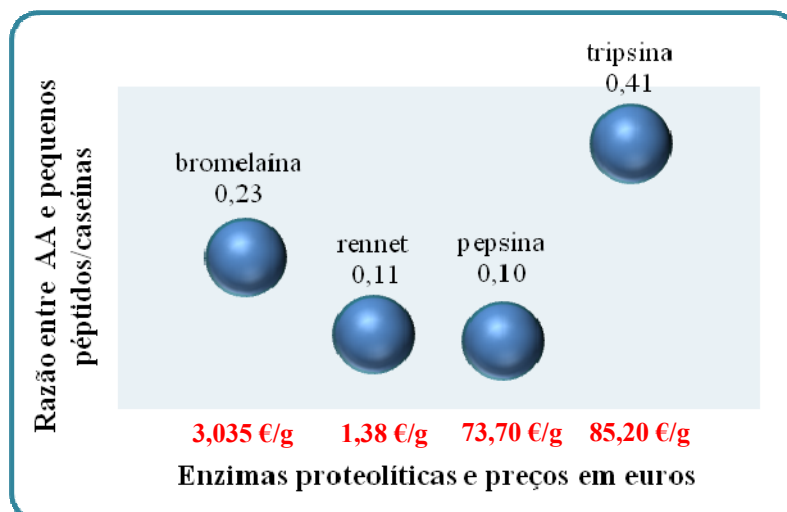


Figura 19 – Razão entre aminoácidos livres e pequenos peptídeos *versus* caseínas (R) de diferentes enzimas proteolíticas, utilizando uma proporção S:E 150:1 mL/mg, e custo em euros por grama de enzima (preços Sigma Aldrich)

De acordo com a Fig. 19, a tripsina apresenta uma hidrólise superior às restantes enzimas, todavia, possui um custo muito elevado e quando adicionada ao leite provoca uma coloração amarelada para além de um sabor amargo, possivelmente, como resultado da libertação de aminoácidos mais hidrófobos do que as restantes. A pepsina foi excluída não só pelo elevado custo como também pela baixa actividade proteolítica. Apesar da rennet ter um custo inferior à bromelaína, a hidrólise é metade da provocada pela segunda, o que significa que para a rennet ter a mesma actividade que a bromelaína seria necessário adicionar o dobro da quantidade ao leite. Além disso, a bromelaína pode ser obtida a partir de um subproduto do ananás açoriano o que, economicamente, seria uma opção mais viável do que a rennet, para além de uma oportunidade de negócio a explorar na região com a produção deste leite em concreto e outros produtos à base desta enzima proteolítica.

6.2. Produção de um leite mais digerível

6.2.1. Leite magro UHT

A Fig. 20 mostra a hidrólise parcial das proteínas do leite magro de bovino (leite UHT) por HPLC variando a quantidade de leite:bromelaína na sequência 200:0, 200:1, 150:1, 100:1, 75:1 e 65:1 mL/mg. Com o aumento da concentração de bromelaína (cromatogramas de A→F) verifica-se uma maior hidrólise nas caseínas (picos de 1 a 5) com consequente crescimento gradual do pico dos aminoácidos livres o que se traduz num aumento do valor de R. A partir do cromatograma B observa-se um aumento gradual na percentagem de hidrólise

das caseínas oscilando entre os 14,4% na proporção 200:1 e os 73,2% nos 75:1 relativamente ao leite magro sem bromelaína (cromatograma A). Estes valores foram obtidos comparando a área total das caseínas no leite modificado relativamente ao leite sem bromelaína.

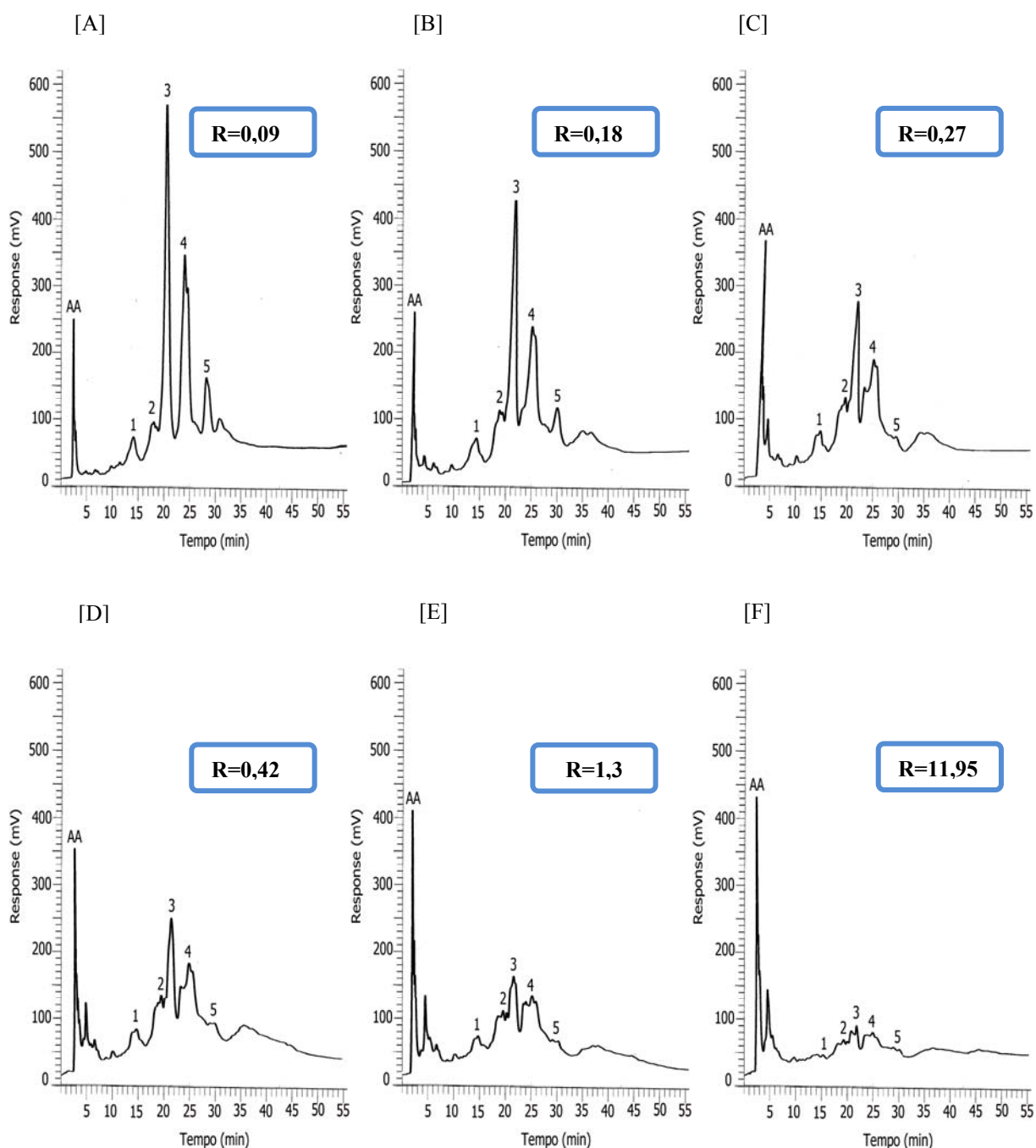


Figura 20 – Variação da hidrólise parcial do leite magro UHT por RP-HPLC com diferentes razões S:E (condições de hidrólise e análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). Legenda. AA – aminoácidos livres, 1 – k-caseína, 2 – α_{S2} -caseína, 3 – α_{S1} -caseína, 4,5 – β -caseína. [A] – S:E = 200:0 mL/mg; [B] – S:E = 200:1 mL/mg; [C] – S:E = 150:1 mL/mg; [D] – S:E = 100:1 mL/mg; [E] – S:E = 75:1 mL/mg; [F] – S:E = 65:1 mL/mg

Esse aumento atinge o máximo na razão S:E 65:1 onde se regista uma hidrólise de 97,7% nas caseínas, resultando na coagulação do leite pois a bromelaína produziu um efeito superior ao desejado conferindo uma instabilidade elevada que resulta na precipitação das proteínas.

A temperatura de incubação da bromelaína no leite foi de 30 °C pois, de acordo com algumas publicações, esta é a temperatura óptima para a actuação da enzima (Baptista & Tavares, 1999). O tempo ao qual foi incubada oscilou entre os 30 minutos e as 4 horas, conforme apresentado na Fig. 21. Partindo de leite magro sem bromelaína ($R=0,09$), constata-se que com o incremento do tempo a hidrólise aumenta sendo visível pelo valor de R. Este aumenta até às 3 horas atingindo depois uma constante ($R=0,40$), o que significa que a bromelaína atinge um ponto de saturação. A variação do valor de R é superior na primeira hora, o que indica que a reacção é ligeiramente mais rápida nesse período (ver Fig. 21). Este dado foi importante para delinear o tempo de incubação da bromelaína aos 30 °C, com consequente redução dos custos energéticos associados à produção à escala industrial deste tipo de leite modificado.

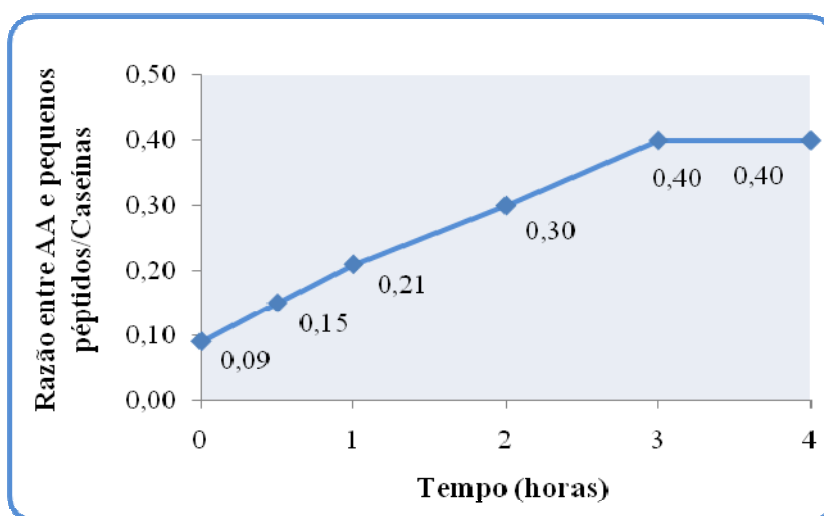


Figura 21 – Razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos *versus* caseínas (R) no leite magro UHT a diferentes tempos de hidrólise, utilizando uma proporção S:E fixa (200:1 mL/mg)

6.2.2. Leite meio gordo UHT

Na Fig. 22 está representado o valor da razão obtida na hidrólise parcial das proteínas do leite de bovino meio gordo UHT. Relativamente ao leite magro UHT, não se verificam diferenças significativas entre os dois tipos de leite em termos de hidrólise. À medida que se aumenta a concentração de bromelaína, na proporção 200:0, 200:1, 150:1, 100:1 e

75:1 mL/mg respectivamente, o grau de hidrólise da enzima aumenta com consequente aumento do valor de R, tal como se verificou para o leite magro. O máximo de hidrólise para o leite meio gordo atinge-se na proporção 100:1 onde se regista uma quebra de 43,9% nas caseínas.

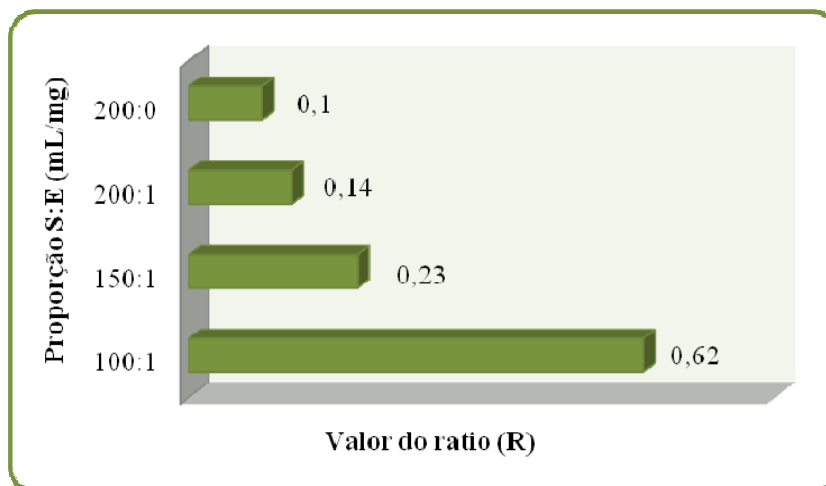


Figura 22 – Comparação do grau de hidrólise do leite meio gordo UHT através do valor de R, utilizando diferentes razões S:E (condições de hidrólise apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”)

Comparando o leite magro e meio gordo UHT em termos de hidrólise parcial nas caseínas, constata-se que nas diferentes proporções S:E analisadas o valor de R em ambos é muito semelhante, excepto para a proporção 100:1 onde se verificou uma hidrólise superior no leite meio gordo, como mostra a Fig. 23. Verificou-se que a proporções inferiores,

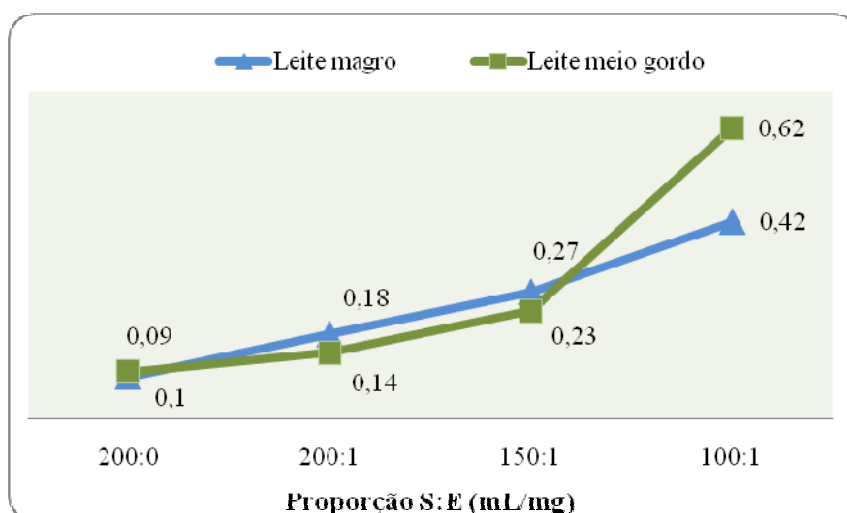


Figura 23 – Comparação entre leite magro e meio gordo UHT através do valor de R, utilizando diferentes razões S:E (200:0 mL/mg; 200:1 mL/mg; 150:1 mL/mg)

nomeadamente 75:1, o leite coagulava na maior parte das vezes com maior preponderância no leite meio gordo. Sendo esta uma proporção S:E muito instável, não se considerou aplicável na unidade fabril pois representaria um processo de risco. Deste modo, considera-se a proporção S:E 100:1 como o limite de segurança para a produção deste leite.

6.2.3. Leite meio gordo termizado

Produzir um leite mais digerível a partir de leite UHT implica necessariamente alterar os procedimentos normais da linha de fabrico do produto, dado que a enzima teria de ser colocada numa fase posterior à ultrapasteurização. Assim, de modo a não alterar o processo de produção do leite, decidiu-se utilizar leite termizado (ver Fig. 12 da secção “Materiais e Metodologias”), uma vez que este está numa fase do processo que permite a inoculação da enzima, sem alterar dramaticamente a linha de produção. Deste modo, procedeu-se à hidrólise do leite termizado da mesma forma que o leite UHT com o intuito de se averiguar a possibilidade de actuar nesta fase de produção do leite.

Ao submeter o leite termizado às mesmas condições que o leite UHT, e conforme a Fig. 24 (cromatogramas de A→C), constata-se que à medida que se aumenta a concentração de bromelaína não se verifica uma hidrólise significativa sendo visível não só pelo valor de R, que se mantém quase inalterável, como também pela altura do pico dos AA e das caseínas

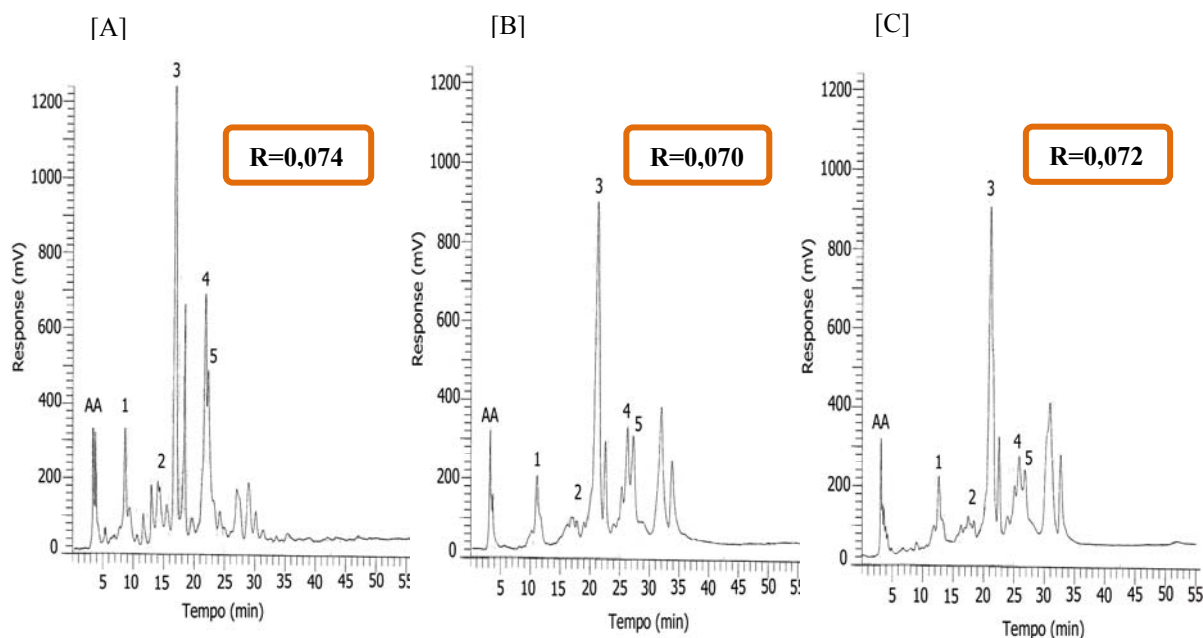


Figura 24 – Variação da hidrólise parcial do leite meio gordo termizado por RP-HPLC com diferentes razões S:E (condições de hidrólise e análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). Legenda: AA – aminoácidos livres, 1 – k-caseína, 2 – α_{S2} -caseína, 3 – α_{S1} -caseína, 4,5 – β -caseína. [A] – S:E = 200:0 mL/mg; [B] – S:E = 100:1 mL/mg; [C] – S:E = 75:1 mL/mg

(picos de 1 a 5) que se mantém constante, como resultado da reduzida ou quase inexistente hidrólise (cromatogramas B e C).

Trabalhar com leite termizado nas mesmas condições utilizadas para leite UHT revelou-se algo muito complicado pois os resultados obtidos (Fig. 24) não foram satisfatórios. Desconhecendo a solução para o problema, apesar da imensa pesquisa bibliográfica efectuada sobre o assunto em causa, foram realizadas em seguida diversas experiências com o intuito de compreender o insucesso na hidrólise das caseínas. Em primeiro lugar aumentou-se a quantidade de bromelaína, embora sem resultados visíveis. Posteriormente, utilizou-se uma outra enzima proteolítica semelhante à bromelaína em termos de hidrólise, a ficina, mas também sem sucesso. Experimentou-se uma mistura com rennet e bromelaína, mas mais uma vez não foi suficiente para provocar hidrólise. Por fim recorreu-se a um composto inorgânico, o carbonato de cálcio, muito utilizado nas indústrias como agente coagulador, juntamente com a bromelaína. Essa combinação não provocou hidrólise das caseínas apesar de ter coagulado o leite. Face aos resultados obtidos, tentou-se ao máximo arranjar alternativas que fossem viáveis para solucionar o problema. Assim sendo, recorreu-se à aplicação de um pré-aquecimento no leite de modo a desnaturar um pouco as proteínas e facilitar a actuação da bromelaína. As temperaturas utilizadas bem como o tempo encontram-se descritos na Tabela 7 da secção “Materiais e Metodologias”.

6.2.4. Leite meio gordo termizado com pré-aquecimento inicial

A temperaturas elevadas as proteínas sofrem um processo de desnaturação perdendo a sua conformação tridimensional e propriedades funcionais. O facto de as proteínas alterarem a sua conformação não modifica o leite em termos nutritivos pois estas serão posteriormente clivadas no estômago quando o leite for ingerido. Com a ultrapasteurização, as proteínas alteram a sua estrutura tornando-se mais degradáveis permitindo, consequentemente, uma actuação mais eficaz da bromelaína. Setou et al. (2008) constataram que o aumento de temperatura facilita a digestão enzimática permitindo uma maior hidrólise nas proteínas. Existe uma maior dificuldade ao trabalhar com leite termizado, muito possivelmente, devido também à camada de fosfolípidos que reveste cada glóbulo de gordura. Esta camada actua como barreira protectora da gordura dificultando a actuação das enzimas pela interacção estabelecida entre estas. O aumento de temperatura induz a separação dos glóbulos facilitando

a actuação de enzimas nas proteínas (O'Mahony, 1988). Estes dois factores podem estar na génese do insucesso ao trabalhar com leite termizado sem aquecimento inicial.

Com a aplicação de uma temperatura inicial no leite termizado, observa-se, ao contrário dos cromatogramas da Fig. 24, uma hidrólise muito superior visível pelo valor de R bem como pela altura do pico dos AA. Numa primeira fase, o objectivo foi encontrar a temperatura ideal que pudesse originar resultados satisfatórios. De acordo com a Fig. 25 constata-se que a uma temperatura de 80 °C obtém-se uma hidrólise maior ($R=0,439$) do que nas restantes temperaturas. Com o aumento desta, verifica-se um incremento na altura do pico dos AA e uma consequente redução nas caseínas como resultado da hidrólise ocorrida. No leite termizado pré-aquecido a 80 °C durante 4 minutos, regista-se uma hidrólise de 58,1% nas caseínas relativamente ao leite meio gordo termizado sem bromelaína (cromatograma A da Fig. 24).

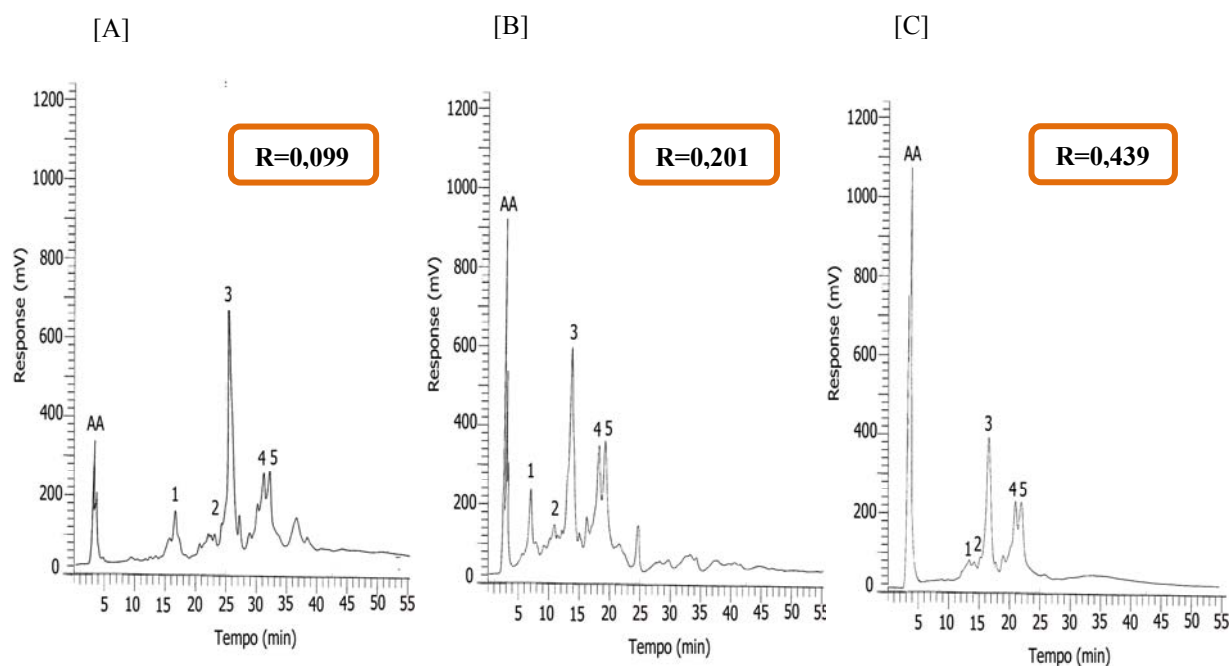


Figura 25 – Variação da hidrólise parcial do leite meio gordo termizado por RP-HPLC submetido a um aquecimento inicial, variando a temperatura e o tempo (condições de hidrólise e análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). Legenda: AA – aminoácidos livres, 1 – κ -caseína, 2 – α_{S2} -caseína, 3 – α_{S1} -caseína, 4,5 – β -caseína. [A] – 65 °C (30 min) (S:E = 100:1 mL/mg); [B] – 70 °C (30 min) (S:E = 100:0,5 mL/mg); [C] – 80 °C (4 min) (S:E = 100:0,5 mL/mg)

Com um pré-aquecimento inferior ou igual a 65 °C obteve-se um baixo grau de hidrólise. Estes resultados não possuem grande interesse pois com baixas temperaturas não se consegue desnaturar as proteínas, tal como verificado por Vasbinder et al. (2003). Ao longo das experiências efectuadas, constatou-se que existe uma relação inversa entre os factores

temperatura e tempo, ou seja, quanto maior a temperatura de aquecimento inicial, menor será o tempo a que o leite fica submetido a essa temperatura; uma pequena variação nesse tempo será de evitar, na medida em que resultará na precipitação das proteínas e consequente coagulação do leite.

Conforme apresentado na Fig. 26, pretendeu-se investigar a variação do grau de hidrólise ao longo do tempo de pré-aquecimento mas mantendo uma temperatura fixa. Utilizando uma temperatura de 75 °C, ao fim de 15 minutos observou-se uma hidrólise mais significativa do que nos primeiros 10 minutos sendo visível pelo valor de R (0,325).

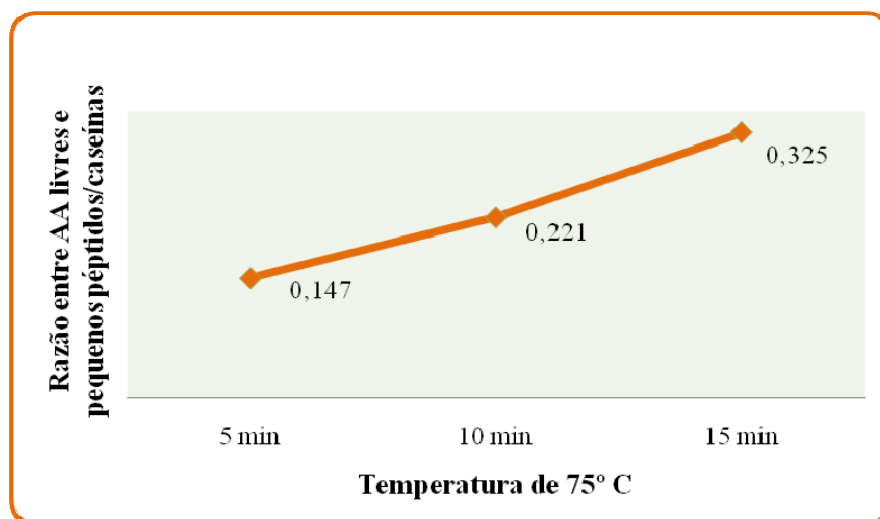


Figura 26 – Razão entre aminoácidos livres e pequenos péptidos *versus* caseínas (R) no leite meio gordo termizado submetido a um pré-aquecimento inicial de 75 °C, variando o tempo e mantendo constante a razão S:E (100:0,5 mL/mg)

Estes resultados mostram claramente que o leite termizado quando submetido a um pré-aquecimento aproxima-se do comportamento do leite UHT em termos de hidrólise parcial das proteínas. É fundamental compreender muito bem o binómio tempo/temperatura pois em termos industriais uma ligeira variação nestes factores pode constituir um enorme prejuízo para a unidade fabril.

Tentar criar em laboratório um leite para depois ser aplicado numa fábrica é algo complicado e exige uma adaptação às condições utilizadas na fábrica, em termos de temperatura, tempo, maquinaria utilizada, entre outros. É um processo difícil e complexo mas não impossível. Em termos teóricos, a produção industrial deste leite funcional seria do modo apresentado na Fig. 27.

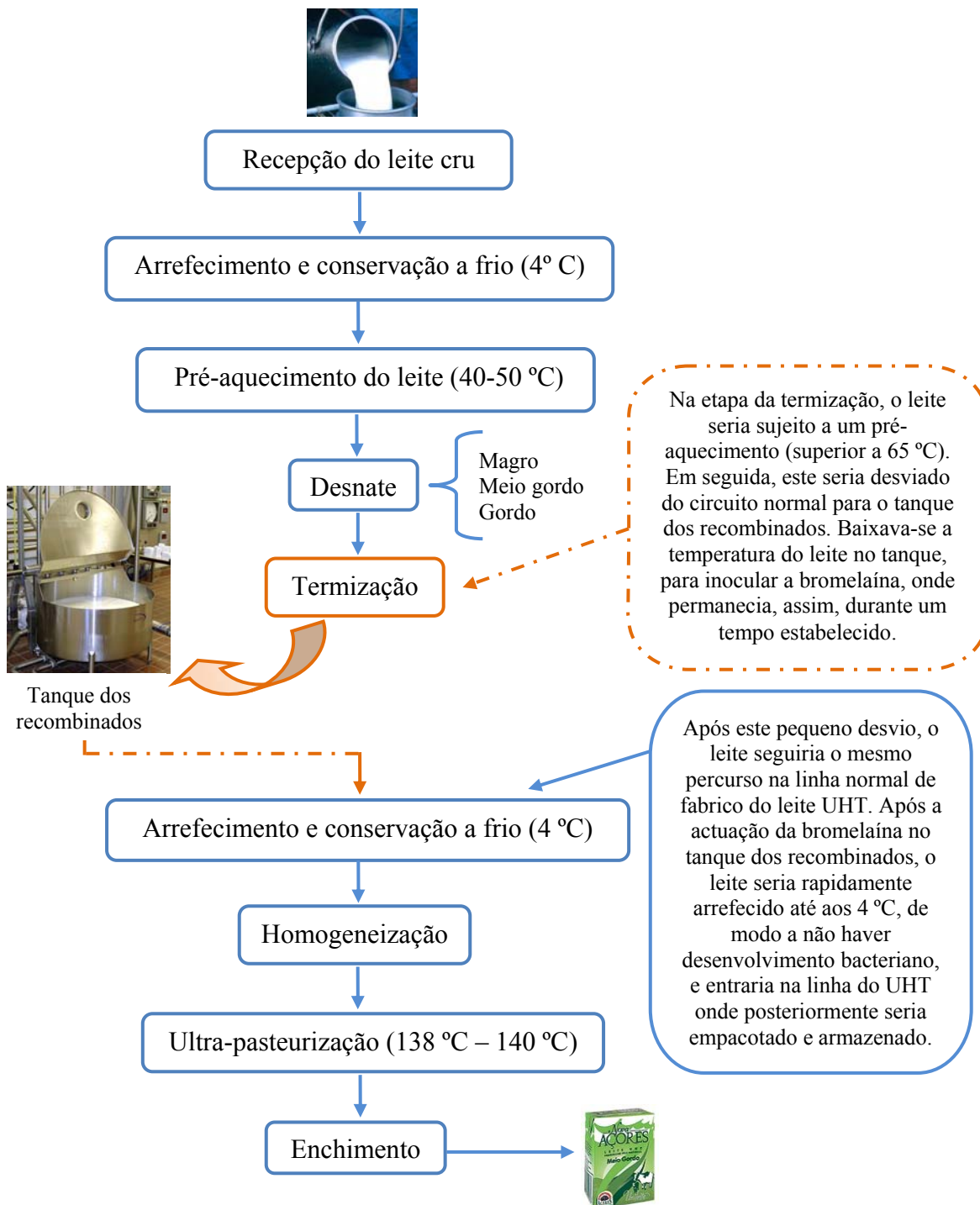


Figura 27 – Diagrama síntese da produção do leite funcional na unidade fabril

No entanto, em termos práticos, existem determinados factores que impossibilitam a produção industrial deste leite funcional do modo como foi apresentado na Fig. 27. Alguns procedimentos terão que ser repensados e discutidos com a Unileite de modo a respeitar os requisitos pretendidos pela fábrica. Para proteger os direitos comerciais da empresa numa posterior comercialização do leite funcional em causa, estes dados serão omitidos desta dissertação de mestrado.

6.3. Análise das propriedades anti-hipertensivas do leite modificado

Existem inúmeros métodos usados para quantificar a actividade *in vitro* da ACE. Após a análise de diversos artigos científicos relativos ao tema, verificou-se que existem três métodos para a determinação da inibição da ACE, nomeadamente, por espectrofotometria, fluorometria e HPLC. De acordo com a bibliografia consultada, o método mais preciso, rápido e eficaz de analisar as características hipotensivas dos péptidos resultantes da hidrólise de proteínas é a cromatografia acoplada com detecção UV (ultravioleta). A actividade da ACE é medida pela sua acção no substrato sintético HHL com consequente formação do HA e do His-Leu. O grau de inibição das amostras é quantificado pelo sinal produzido pelo HA no sistema cromatográfico. Quanto menor a quantidade de HA medida (relativamente ao controlo), maior será o grau de inibição da enzima e, consequentemente, maior o efeito hipotensivo dos péptidos das amostras analisadas (Fig. 28).

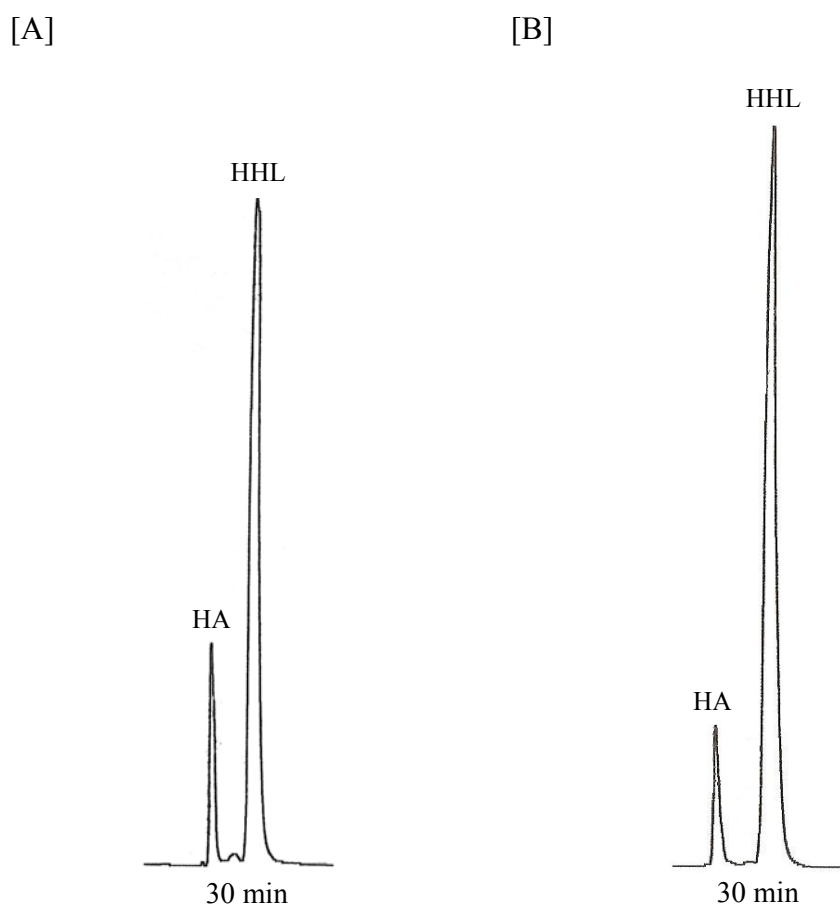


Figura 28 – Determinação da actividade inibitória da ACE por HPLC (condições de análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”). [A] – Cromatograma com a representação do HA (controlo); [B] – Cromatograma com a representação do HA numa amostra de leite parcialmente hidrolisado com bromelaína

6.3.1. Determinação da velocidade máxima da ACE

A velocidade da reacção da ACE ao longo do tempo foi medida por HPLC. As sucessivas injecções dadas em diferentes intervalos de reacção (0, 15, 30, 45 min) permitiram visualizar o decréscimo do HHL e consequente aumento do HA ao longo dos 45 minutos, como se pode observar na Fig. 29.

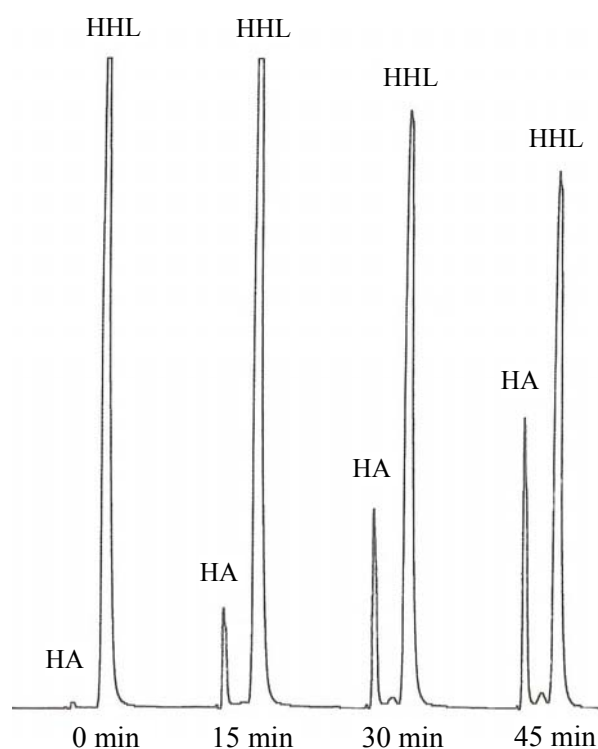


Figura 29 – Cromatogramas referentes à produção de HA ao longo de intervalos pré-definidos utilizados para o cálculo da velocidade da reacção (condições de análise por HPLC apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”)

6.3.2. Análise de amostras de leite UHT e leite termizado

6.3.2.1. Sem diálise

Inicialmente começou-se por analisar o efeito anti-hipertensivo *in vitro* do leite magro e do leite meio gordo UHT com bromelaína, sem diálise prévia, em 3 proporções S:E diferentes e utilizando como controlo o leite sem bromelaína (magro e meio gordo consoante o tipo de leite em estudo). Através da Fig. 30 é possível constatar que não existem diferenças significativas entre estes dois tipos de leite em termos de proporções S:E analisadas, o que faz sentido pois a quantidade de proteína entre leite magro e meio gordo é a mesma (3,2 g por 100 mL de leite), apenas diferem na quantidade de gordura presente em ambos (0,1 g e 1,6 g

de lípidos, respectivamente, por 100 mL de leite). A proporção 75:1 (S:E) não foi analisada no leite meio gordo uma vez que esta proporção resulta, na maior parte das vezes, na precipitação das proteínas do leite, facto que impossibilitou o posterior estudo da percentagem de inibição da ACE. A conclusão mais proeminente que se retira destes testes realizados é que quanto maior a proporção S:E, menor será o efeito inibidor da ACE. De acordo com alguns autores (Janitha et al., 2002; Jiang et al., 2010), a actividade inibitória da ACE está relacionada com o grau de hidrólise provocada nas caseínas, ou seja, quanto menor a quantidade de leite, mais concentrada está a bromelaína, logo maior a hidrólise provocada nas caseínas, e por conseguinte, maior será a quantidade de péptidos produzidos.

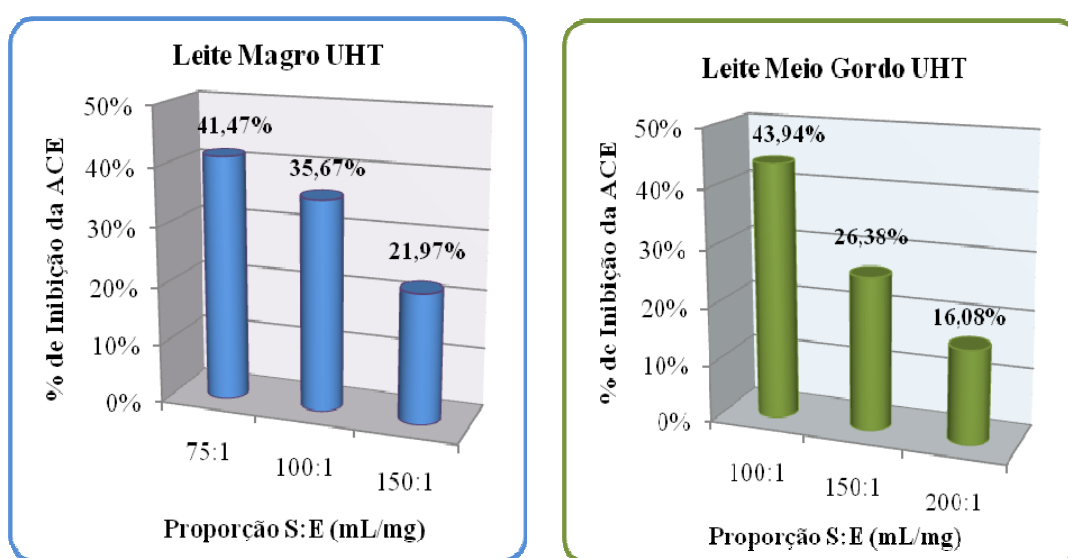


Figura 30 – Percentagem de inibição da ACE das diferentes proporções S:E do leite magro e meio gordo UHT (condições de análise apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”)

Em seguida procedeu-se ao estudo *in vitro* do leite meio gordo termizado (Fig. 31), sem diálise prévia e utilizando sempre a mesma razão S:E (100:0,5). O leite foi submetido a um pré-aquecimento inicial utilizando as mesmas temperaturas e tempos nos quais se registaram os melhores valores de R no processo de hidrólise com bromelaína (70 °C – 30 min, 75 °C – 15 min e 80 °C – 4 min). Analisando os resultados obtidos, e comparando com o leite meio gordo termizado sem bromelaína (100:0), observa-se que não existem diferenças significativas entre as diferentes temperaturas e tempos utilizados. A percentagem de inibição na ACE foi em todos os casos inferior a 20%. Estes valores indicam claramente que ainda não se conseguiu alcançar a percentagem de inibição obtida no leite UHT, ou seja, as modificações promovidas nas proteínas no leite UHT pelo processo de ultrapasteurização são diferentes das provocadas no leite termizado submetido a um pré-aquecimento inicial. Apesar

das semelhanças existentes em termos de hidrólise provocada pela bromelaína entre leite UHT e termizado, relativamente à inibição da ACE não se observou a mesma coisa. Face aos resultados, mais estudos serão necessários com vista à obtenção de uma inibição igual ou superior ao leite UHT.

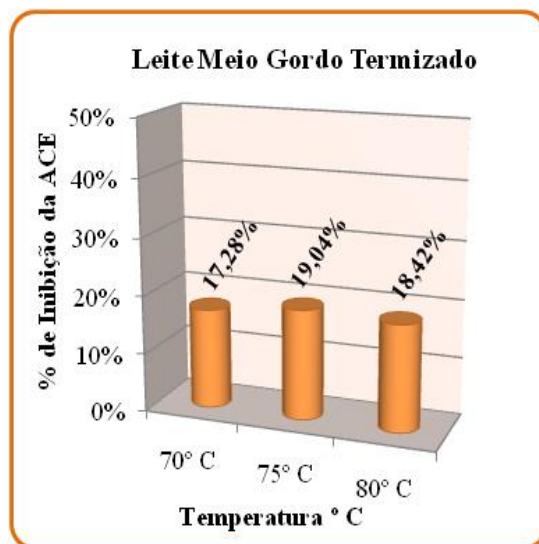


Figura 31 – Percentagem de inibição da ACE do leite meio gordo termizado analisado na mesma proporção S:E (100:0,5) mas diferindo no tempo e temperatura de pré-aquecimento inicial (condições de análise apresentadas na secção “Materiais e Metodologias”)

6.3.2.2. Após diálise

Após concluídas as análises ao leite magro e meio gordo UHT e ao leite meio gordo termizado, sem diálise prévia, procedeu-se ao estudo das fracções obtidas na diálise efectuada ao leite UHT (ver ponto 5.3.2 da secção “Materiais e Metodologias”). Utilizou-se uma amostra de leite meio gordo UHT, na proporção 100:1, e seguiu-se o mesmo procedimento usado para testar o efeito anti-hipertensivo. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 9. A conclusão mais relevante que se retira dos testes efectuados é que a fracção proteica compreendida entre os 10–3 kDa apresenta um maior poder inibidor da ACE. Isto significa que os péptidos mais potentes têm um peso molecular situado entre os 10–3 kDa.

Tabela 9 – Percentagem de inibição da ACE (e respectivo valor do desvio padrão) das fracções proteicas após diálise, à concentração de 25 mg/mL, utilizando uma amostra de leite meio gordo UHT (100:1)

Fracções proteicas	Inibição da ACE (%)	Desvio padrão
> 10 kDa	29,57	1,21
10–3 kDa	75,92	2,65
< 3 kDa	14,03	0,17

De acordo com Hong et al. (2008), os péptidos com peso molecular inferior a 3 kDa apresentam um maior poder de inibição da ACE. Todavia, a fracção analisada mostrou ser a menos activa. Isto pode ser explicado devido ao facto de esta fracção conter sobretudo gordura (ácidos gordos), sais minerais (fosfato, cálcio), vitaminas e outros compostos de pequena dimensão, nomeadamente AA e pequenos péptidos (Fox, 1989). No entanto, estes deverão existir em quantidade reduzida pelo que o seu efeito é, de certa forma, pouco relevante. A fracção com peso molecular superior a 10 kDa é composta maioritariamente por proteínas intactas ou parcialmente intactas. Segundo Hong et al. (2008), as sequências peptídicas formadas por um número reduzido de péptidos são mais potentes que as formadas por longas cadeias, facto este que pode justificar o baixo poder inibidor da referida fracção.

De salientar que a actividade inibidora de um péptido não é somente avaliada pelo comprimento da cadeia mas também pela composição dos aminoácidos da região C-terminal. Regiões formadas por aminoácidos hidrófobos, por exemplo triptofano, tirosina, prolina ou fenilalanina, são mais activas se presentes em cada uma das três posições da região C-terminal. A presença de aminoácidos com carga positiva, como a lisina, guanidina ou arginina, também pode conferir uma maior potência em termos de inibição da ACE (Quirós et al., 2009; Jiang et al., 2010). Efectivamente, a natureza dos aminoácidos que constituem a região C-terminal da sequência peptídica é crucial para a ligação do substrato ao centro activo da enzima ACE. A substituição de alguns resíduos de aminoácidos na região C-terminal por outros influencia a ligação e a capacidade inibitória do péptido formado (Quirós et al., 2009).

As fracções proteicas foram analisadas utilizando uma só proporção S:E pois pressupõe-se que as restantes proporções deverão seguir a mesma tendência uma vez que qualitativamente a composição proteica de cada fracção será idêntica, variando apenas a quantidade disponível de acordo com o grau de hidrólise produzido pela bromelaína.

6.3.3. Determinação do tipo de inibição

O tipo de inibição provocado pela adição do leite parcialmente hidrolisado na reacção mostrou ser muito próximo do não competitivo, como se pode constatar através da curva de Lineweaver-Burk (Fig. 32). Os péptidos do leite parcialmente hidrolisados vão actuar, na sua generalidade, como substratos não competitivos. Estes substratos ligam-se reversivelmente à enzima num local diferente do centro activo, não impedindo, deste modo, a ligação da angiotensina I à ACE. Contudo, o centro activo da enzima fica, de certa forma, afectado pela presença do inibidor. Consequentemente, esta ligação ocorre com menos facilidade,

diminuindo a velocidade da reacção da ACE (Campos, 1998). É de referir que as amostras analisadas são uma mistura complexa de péptidos com diferentes propriedades e funções sendo, por isso, difícil definir um padrão preciso relativamente ao tipo de inibição provocada na ACE. De acordo com alguma pesquisa bibliográfica feita, constatou-se que a maioria dos inibidores da ACE resultantes da hidrólise de proteínas alimentares são inibidores competitivos. Isto significa que estes inibidores ligam-se ao centro activo da enzima, impedindo a ligação da angiotensina I (Wu & Ding, 2002; Jiang et al., 2010). Todavia, também se verifica a existência de péptidos inibidores da ACE que exercem uma actividade não competitiva (Jiang et al., 2010). Isto significa que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

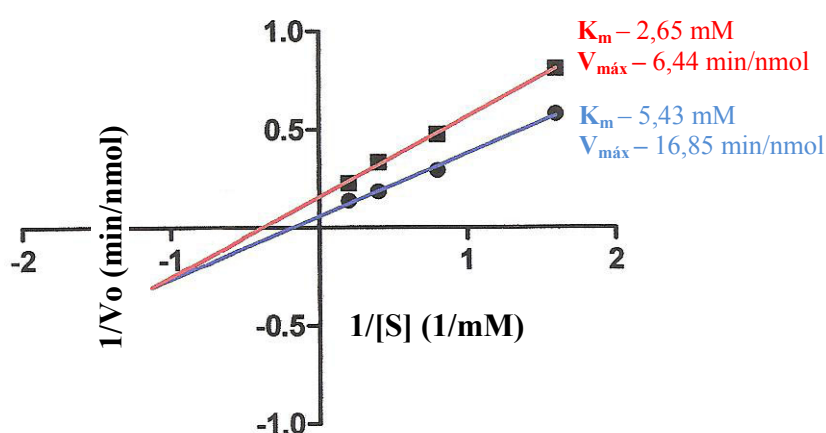


Figura 32 – Curva de Lineweaver-Burk da inibição da ACE pela amostra resultante da hidrólise parcial do leite meio gordo UHT (S:E 100:1) e respectivos parâmetros cinéticos. Vermelho – amostra de leite; azul – controlo (leite meio gordo UHT sem bromelaína)

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$, representados na Fig. 32, foram calculados para a amostra de leite e respectivo controlo. A amostra de leite parcialmente hidrolisada possui bastante afinidade para se ligar à ACE dado o baixo valor de K_m registado relativamente ao controlo. Com efeito, a ligação substrato-enzima ocorre mais facilmente permitindo que a reacção com a ACE ocorra mais rapidamente.

A ideia inicial foi simplesmente averiguar se as amostras de leite parcialmente hidrolisadas com a enzima bromelaína provocariam ou não uma inibição *in vitro* na ACE. Os resultados foram positivos pois observou-se uma inibição razoável na ACE. Face aos resultados obtidos, o passo seguinte foi saber qual o tipo de inibição provocada pela amostra de leite analisada. O tipo de inibição obtido pela curva de Lineweaver-Burk não foi muito precisa pois ao trabalhar com uma amostra complexa, e não pura, torna-se algo difícil tentar definir um padrão. Apesar da dificuldade encontrada, realmente constatou-se uma alteração

provocada na actividade da ACE pela presença das amostras de leite parcialmente hidrolisadas com bromelaína relativamente ao controlo utilizado (leite sem bromelaína). Estes resultados demonstram que a produção de um leite com proteínas parcialmente modificadas por uma enzima proteolítica, indubitavelmente, provocam um efeito hipotensivo *in vitro*. Certamente os procedimentos utilizados para a produção deste leite terão que ser aprofundados com o intuito de obter, no futuro, uma maior inibição da ACE e, por conseguinte, um maior efeito hipotensivo.

6.4. Análise sensorial ao leite meio gordo UHT modificado

Nas últimas décadas têm-se desenvolvido cada vez mais fórmulas com proteínas do leite bovino parcialmente hidrolisadas, dado o sabor mais amargo e o elevado custo das fórmulas disponíveis no mercado. Este sabor mais amargo pode contribuir para uma menor ingestão de leite e, conseqüentemente, agravamento das alergias e malnutrição (Estrada-Reyes et al., 2006; Pedrosa et al., 2006).

A análise sensorial é utilizada para analisar, medir e interpretar reacções às características sensoriais dos alimentos. Surgiu como Ciência nos anos 40 nos países Escandinavos e nos EUA, e na Europa só em finais da década de 50. A análise sensorial pode aplicar-se no estudo e desenvolvimento de (novos) produtos, em testes de tempo de vida útil de produtos, testes de mercado, controlo de qualidade, entre outros (Esteves, 2009).

A qualidade sensorial de um produto deve ser considerada como um factor chave para a aceitação de um alimento, porque os consumidores procuram produtos com determinadas características sensoriais. A aceitação do produto irá depender das necessidades do consumidor e do grau de satisfação que o mesmo pode originar (Costell et al., 2010). Assim sendo, tornou-se fundamental a realização de uma análise sensorial ao leite funcional produzido, resultante da hidrólise parcial das proteínas do leite bovino. O leite foi submetido a um painel sensorial formado por 28 indivíduos voluntários. Efectuou-se um teste de comparação-par entre o leite meio gordo UHT modificado e o leite meio gordo UHT convencional. Os testes de comparação-par (ISO 5495:2005) são testes relativamente simples, utilizam-se para determinar se existem diferenças entre as duas mostras de produtos a analisar (Esteves, 2009). De seguida serão apresentados os resultados da análise sensorial efectuada.

Através da Fig. 33 constata-se que uma percentagem significativa de indivíduos inquiridos considerou que o leite com bromelaína possuía um sabor agradável relativamente à

amostra do leite convencional. Da totalidade dos indivíduos, 25% achou-o muito agradável e apenas 14% notou um sabor desagradável no leite modificado.

De acordo com Bus e Worsley (2002), as propriedades organolépticas, o custo, a conveniência, os hábitos individuais e familiares de consumo, questões socioeconômicas e demográficas, o conhecimento nutricional e as preocupações em torno do conteúdo em gordura e colesterol, constituem factores que influenciam o consumo de produtos lácteos de diversos tipos. Estes parâmetros podem condicionar o interesse dos indivíduos em participar em análises sensoriais devido ao preconceito e à opinião pré-concebida que estes possuem independentemente do produto lácteo a analisar.

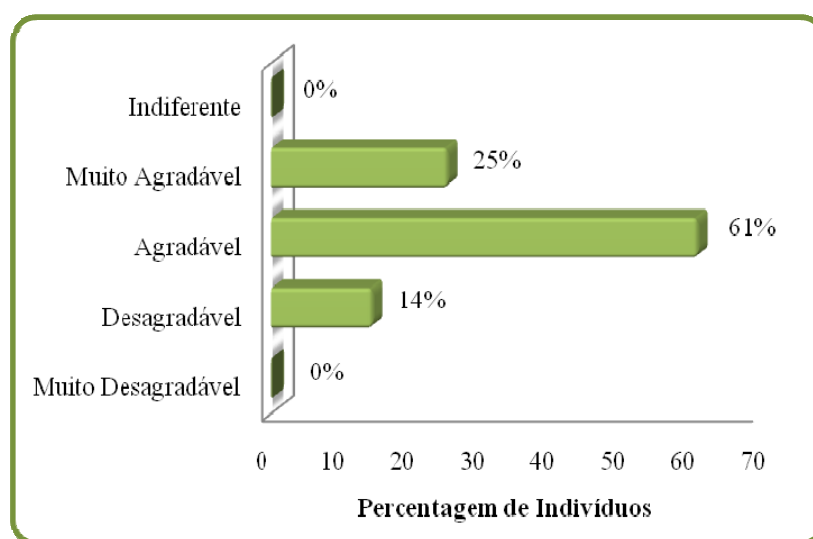


Figura 33 – Resultados da análise sensorial ao parâmetro “sabor” do leite com bromelaína

O sabor é um dos factores mais importante na escolha de um alimento. No que respeita ao tipo de leite preferencial, os consumidores preferem leite com elevados teores de gordura. Contudo, estudos demonstram que o consumo de leite com baixo teor de gordura, nomeadamente leite magro, deve-se às crenças dos consumidores sobre os benefícios nutricionais do mesmo, sobretudo redução dos riscos de hipertensão, cáries dentárias, cancro do cólon, problemas cardiovasculares, entre outros, do que ao seu sabor. Muitos indivíduos não têm a noção da importância do leite e seus produtos derivados, principalmente como fonte essencial de cálcio e como este mineral é fundamental para a estrutura óssea, a nível da prevenção da osteoporose (Bus e Worsley, 2002).

Para além do sabor, outro parâmetro analisado nesta análise sensorial foi o “aspecto” do leite modificado. Através da Fig. 34, observa-se que a totalidade dos indivíduos inquiridos não identificou qualquer diferença entre o leite modificado e o leite convencional, considerando este parâmetro pouco relevante para a análise.

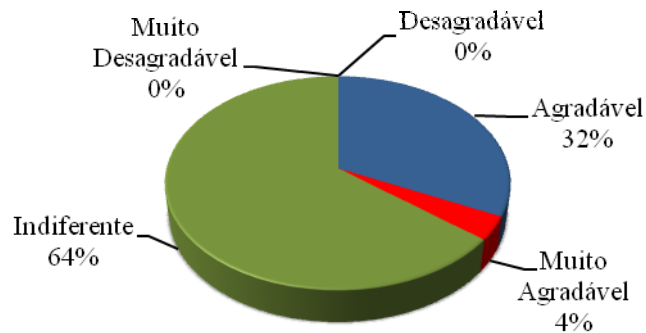


Figura 34 – Resultados da análise sensorial ao parâmetro “aspecto” do leite com bromelaína

Fazendo uma comparação entre o leite meio gordo UHT com bromelaína e o leite meio gordo UHT convencional (Fig. 35), verifica-se que 86% dos indivíduos consideram o leite modificado agradável e apenas 14% dos inquiridos notou algo de diferente no primeiro leite mas não o identificou. No campo “observações”, existente em cada inquérito, constatou-se que alguns indivíduos (10,7%) sentiram um ligeiro sabor ressequido na boca quando ingeriram o leite modificado. Contudo, 7,1% dos participantes acharam que este leite possuía um sabor mais intenso que o leite normal e apenas 3,6% notou um sabor mais amargo.

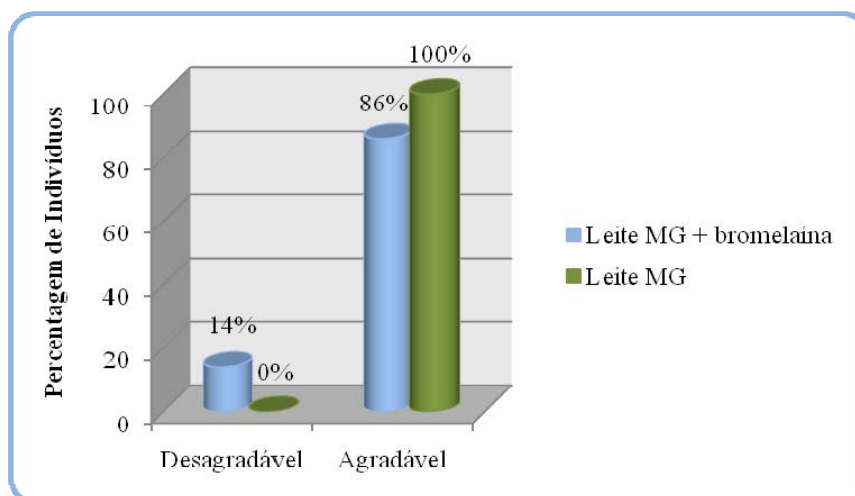


Figura 35 – Resultados da análise sensorial efectuada ao leite meio gordo UHT com bromelaína versus leite meio gordo UHT convencional. MG – meio gordo

Através desta análise sensorial efectuada ao leite parcialmente hidrolisado com a enzima bromelaína, constatou-se que, no geral, os indivíduos inquiridos gostaram do sabor do leite modificado, não o consideraram muito diferente do leite meio gordo normal disponível no mercado, em termos de aspecto e características organolépticas. Assim sendo, pode-se concluir que a enzima proteolítica utilizada não origina péptidos com sabor amargo, ao contrário de certas proteases como a tripsina, o que se traduz num paladar agradável.

Conclusão

Com os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se mostrar que a ideia de produzir um leite funcional para pessoas intolerantes às proteínas do leite bovino através da hidrólise parcial das mesmas é possível. O leite produzido desta forma representa uma mais valia para adultos e crianças pela conservação das suas propriedades funcionais, dado que as fórmulas hipoalergénicas disponíveis no mercado são maioritariamente produtos hidrolisados em pó que não conservam as propriedades naturais do leite. Estas fórmulas, como foi explorado anteriormente, não são economicamente acessíveis a todas as pessoas e algumas até são produtos farmacêuticos com necessidade de prescrição médica.

As possíveis propriedades hipoalergénicas e hipotensivas deste leite funcional (estas últimas testadas *in vitro*) terão que, evidentemente, ser analisadas *in vivo* com recurso a um estudo clínico piloto com um número restrito de indivíduos intolerantes às proteínas do leite e hipertensos, seguido depois por estudos em maior escala, caso se comprove a inocuidade do leite. A ideia será seguir estes indivíduos durante um determinado período de tempo de modo a testar a segurança e a eficácia do leite modificado antes de ser introduzido no mercado.

De salientar que após comprovado o efeito hipotensivo *in vivo* do leite modificado, este deverá ser visto como um produto nutracêutico e não como um medicamento. Por outras palavras, um indivíduo diagnosticado clinicamente como hipertenso não deverá substituir os medicamentos prescritos pelo médico por este leite funcional pois o efeito hipotensivo provocado por este novo produto não é o mesmo que o provocado pelos medicamentos. Os nutracêuticos são alimentos testados clinicamente e que proporcionam benefícios à saúde, como a prevenção ou o tratamento de doenças. São aliados para a saúde humana mas não elaborados com finalidade profilática, curativa, paliativa ou até mesmo para fins de diagnóstico como é o caso dos produtos farmacêuticos.

A criação deste novo produto constitui uma alternativa viável para as indústrias de laticínios pois, segundo a literatura consultada, não existe leite modificado com a enzima investigada (bromelaína) no mercado nacional nem internacional. Deste modo, comprovando-se a funcionalidade do produto, este poderá constituir uma boa fonte de rendimentos para a região concorrendo com os produtos provenientes do exterior.

Perspectivas de trabalho futuro

O trabalho realizado até agora permitiu tirar conclusões acerca: da possibilidade de criar um leite mais digerível com proteínas parcialmente hidrolisadas com uma enzima proteolítica, neste caso a bromelaína, do modo de produção industrial deste leite modificado e das suas propriedades hipotensivas *in vitro* pela inibição da ACE.

Na sequência deste trabalho, e de acordo com a literatura, o passo seguinte ao estudo das fracções proteicas do leite modificado seria certamente a separação em sub-fracções, por uma metodologia sequencial de métodos cromatográficos, e a análise de cada uma delas, novamente, tendo em vista a inibição da ACE (Janitha et al., 2002; Mao et al., 2007). Da(s) sub-fracção(ões) mais activa(s) deveriam ser isolados e purificados os seus elementos constituintes para posterior caracterização através de um analisador proteómico MALDI-TOF/TOF (Martin et al., 2008; Jiang et al., 2010). Posteriormente, os péptidos já isolados e caracterizados seriam submetidos a uma confirmação da sua actividade anti-hipertensiva *in vitro* seguido de um processo de simulação da digestão gástrica, recorrendo a enzimas digestivas para o efeito, com o intuito de testar a resistência dos péptidos à degradação gastrointestinal quando ingeridos. A actividade anti-hipertensiva de um péptido *in vivo* depende do tipo de péptidos formados após a digestão gastrointestinal e da constituição da região C-terminal (Wu & Ding, 2002; Ledesma-Hernández et al., 2004; Quirós et al., 2009).

O isolamento e caracterização dos péptidos constituintes da fracção 10–3 kDa, e posterior simulação do processo digestivo, seria algo muito aliciante e interessante de investigar. No entanto, uma vez que se trata de um trabalho demorado e complexo, que pressupõe a utilização de algumas técnicas para as quais seria necessário um período natural de formação e aprendizagem, bem como a utilização de tecnologia que não se encontra disponível na Universidade dos Açores, a sua execução seria inviável durante o período do mestrado. Fica, assim, aberto o caminho a uma continuação do estudo do presente tema.

Bibliografia

- Alban S, Franz G, Franz M (1997)** Influence of the therapeutically used enzymes bromelain, papin, and trypsin on the blood coagulation *in vitro*. *Pharmac Pharmacol Lett* 7(2–3):5–62
- Aleixandre A, Miguel M, Muguerza B (2008)** Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leite e ovo. *Nutr Hosp* 23(4):313–318
- Anthony J C, Anthony T G, Kimball S R, Jefferson L S (2001)** Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 131:856S–860S
- Arroyo-Reyna A, Hernandez-Irana A (1995)** The thermal denaturation of stem bromelain. *Biochimic Biophys* 1248(2):123–128
- ASSA – “Allergy Society of South Africa” (1997)** <http://www.allergy-sa.org/main.htm>. Último acesso 27/08/2009
- Balbis E, Patriarca S, Furfaro A, Millanta S, Sukkar S, Marinari U, Pronzato M, Cottalasso D, Traverso N (2009)** Whey proteins influence hepatic glutathione after CCl₄ intoxication. *Toxicol Ind Health* 25(4–5):325–328
- Banks W, Dalglish D G (1990)** Milk and milk processing. In : Robinson R K (eds) Dairy Microbiology – The Microbiology of milk, 2^a ed., New York, USA.
- Baptista J, Tavares J, Jerónimo M (1998)** Proteínas do lactosoro-poluição ou mais valia. Determinação da sua capacidade de gelificação. *Açoreana* 8(4):545–557
- Baptista J, Tavares J, Carvalho R, Jerónimo M (1999)** Isolation, partial characterization and applications of azorean pineapple stem proteinases (bromelains). *Açoreana* 9(1):63–84
- Baptista J, Tavares J (2004)** Cultura de ananás em estufa Ilha de S.Miguel – Açores (Portugal), Profrutos – Cooperativa de Produtores de Frutas, Produtos Hortícolas e Florícolas de S. Miguel, Ponta Delgada
- Barrett A, Rawlings N, Woessner J (2004)** The handbook of proteolytic enzymes, 2^a ed., Elsevier academic press, London.
- Bennett B C (2000)** Ethnobotany of Bromeliaceae: Bromeliaceae profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, London.
- Bennett G, Withehead S (1983)** Control of gonadotrophic hormone secretion. In: Bennett G, Withehead S (eds) Mammalian neuroendocrinology, Croom Helm Ltd, Provident House, Burrell Row, Beckenham, Kent BR3 1AT
- Biasutti E A R (2006)** Optimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina. Faculdade de farmácia da UFMG. Belo Horizonte. Brasil.
- Brill H (2008)** Approach to milk protein allergy in infants. *Can Fam Physician* 54:1258–126
- Burks W, Helm R, Stanley S, Bannon GA (2001)** Food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1(3):243–8

- Bus A E M, Worsley A (2002)** Consumers' sensory and nutritional perceptions of three types of milk. *Public Health Nutr* 6(2):201–208
- Campos L S (1998)** Cinética das reacções bioquímicas. In: Campos L S (1998) Entender a Bioquímica – O metabolismo fundamental em animais e plantas, Escolar Editora, Lisboa.
- Chen Z Y, Peng C, Jiao R, Wong Y M, Yang N, Huang Y (2009)** Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem* 57:4485–4499
- Costell E, Tárrega A, Bayarri S (2010)** Food acceptance: the role of consumer perception and attitudes. *Chem Percept* 3(1):42–50
- Creamer L K, Plowman J E, Liddell M J, Smith M H, Hill J P (1998)** Micelle stability: k-casein structure and function. *J Dairy Sci* 81:3004–3012
- Cuheval A, Algobashy M, Hemar Y, Otter D, Williams (2009)** Direct measurements of interfacial interactions between pectin and k-casein and implications for the stabilization of calcium-free casein micelle mimics. *J Colloid Interface Sci* 338(2):450–462
- Curciarello R, Lareu J F, Fossati C A, Docena G H, Petruccelli S (2008)** Immunochemical characterization of *Glycine max* L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clin Exp Allergy* 38(9):1559–1565
- Devakate R, Patil V, Waje S, Thorat B, (2009)** Purification and drying of bromelain. *Sep Purif Technol* 64:259-264
- Docena G, Fernandez R, Chirido F, Fossati C (1996)** Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51(6):412–416
- Dorlands Medical Dictionary (2009)** Athopic. http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dorlands_split.jsp?pg=/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/one/000010034.htm. Último acesso 27/08/2009
- Elliott L, Henderson J, Northstone K, Chiu G, Dunson D, Londson S (2008)** Prospective study of breast-feeding in relation to wheeze, atopy, and bronchial hyperresponsiveness in the avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC). *J Allergy Clin Immunol*. 122(1):49–54
- Esteves E (2009)** Análise sensorial. http://w3.ualg.pt/~eesteves/docs/Microsoft%20Word%20-%20AnaliseSensorial_091.pdf. Último acesso 09/02/2010
- Estrada-Reyes E, Garcia-Hernández G, Martínez-Gimeno A, Nava-Ocampo A (2006)** Effect of extensively hydrolyzed milk formula on growth and resistance to bronchitis and atopic dermatitis in infants and toddlers. *J Investig Allergol Clin Immunol* 16(3):183–187
- FitzGerald R, Murray B, Walsh D (2004)** Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 980S–988S

- Fox P F (1989)** The milk protein system. In: Fox P F (eds) *Developments in Dairy Chemistry* – 4, New York, USA.
- Fox P F, McSweeney P (2004)** Cheese: an overview. In: Fox P F, McSweeney P, Cogan T, Guinee T (eds) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3^a ed., Ireland.
- Franz von Soxhlet. Wikipédia (2009)** [http://en.wikipedia.org/wiki/ Franz_von_Soxhlet](http://en.wikipedia.org/wiki/Franz_von_Soxhlet). Último acesso 19/08/2009
- Fyhrquist F, Saijonmaa O (2008)** Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264:224–236
- Giangiaco­mo R, Nigro F, Cattaneo T (1991)** Approccio tecnologico per la preparazione di un latte alimentare con matrice proteica modificata in seguito a trattamento enzimático. *Riv. Soc. It. Sci. Aliment* 20(6):377–385
- Gregory K, (1996)** Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications. *Alt Med Rev* 1(4):243–257
- Guang C, Phillips R (2009)** Plant food-derived angiotensina I converting enzyme inhibitory peptides. *J Agric Food Chem* 57:5113–5120
- Hakkak R, Korourian S, Ronis M J, Johnston J M, Badger T M (2001)** Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 10(5):555–8
- Hedstrom L (2002)** Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102:4501–4523
- Heinicke R, Gortner W (1957)** Stem bromelain-a new protease preparation from pineapple plants. *Econ Bot* 11:225–234
- Hoffman J R, Falvo M J (2004)** Protein-which is best? *J Sports Sci Med* 3:118–130
- Hong F, Ming L, Yi S, Zhanxia L, Yongquan W, Chi L (2008)** The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides* 29:1062–1071
- Horne D S (1984)** Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers* 23:989–993
- Infopédia (2010)** Enciclopédia e Dicionários Porto Editora. [http://www.infopedia.pt/\\$liofilizacao](http://www.infopedia.pt/$liofilizacao). Último acesso 18/07/2010.
- Janitha P, Wanasundara P, Ross A, Amarowicz R, Ambrose S, Pegg R, Shand P (2002)** Peptides with angiotensina I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *J Agric Food Chem* 50:6981–6988
- Jiang Z, Tian B, Brodcrob A, Huo G (2010)** Production, analysis and *in vivo* evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chem* 123:779–786
- Kaplan A, Greaves M (2005)** Angioedema. *J Am Acadf Dermatol* 53(3): 373–388

- Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Neto U, Gopalan S, Hernell O, Hock Q, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D (2005)** Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41:584–599
- Korhonen H (2009)** Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *J Funct Foods* 1(2):177–187
- Krissansen G W (2007)** Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J Am Coll Nutr* 26(6):713–23
- Ledesma-Hernández B, Amigo L, Ramos M, Recio I (2004)** Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *Int Dairy J* 14:889–898
- Liu Y, Guo R (2009)** The interaction between casein micelles and gold nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 332:265–269
- Majjala K (2000)** Cow milk and human development and well-being. *Livest Prod Sci* 65:1–18
- Marshall K (2004)** Therapeutic applications of whey protein: review. *Alt Med Rev* 9(2):136–156
- Martin M, Wellner A, Ossowski I, Henle T (2008)** Identification and quantification of inhibitors for angiotensin-converting enzyme in hypoallergenic infant milk formulas. *J Agric Food Chem* 56:6333–6338
- Mao X, Ni J, Sun W, Hao P, Fan L (2007)** Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chem* 103:1282–1287
- McMahon D J, Oommen B S (2008)** Supramolecular structure of the casein micelle. *J Dairy Sci* 91:1709–172
- Medeiros V, Paiva L, Lima E, Baptista J (2009)** Milk protein modification by proteolytic enzymes. Effect on the milk digestibility. In: Abstracts of the 9º Encontro de Química dos Alimentos, Terceira, Açores, 29 de Abril–2 de Maio de 2009.
- Mier M P, Ibáñez R, Ortiz I (2007)** Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes. *Biochem Eng J* 40:304–11
- Miniello V, Francavilla R, Brunetti L, Lauria B, Lieggi M, Lippolis P, Ricapito V, Armenio L (2008)** Primary allergy prevention: partially or extensively hydrolyzed infant formulas? *Minerva Pediatr* 60(6):1437–43
- Mulvihill D M (1989)** Casein and caseinates: manufacture. In: Fox P F (eds) *Developments in Dairy Chemistry – 4*, New York, USA.

- Nakai S, Li-Chan E (1989)** Chemical and enzymatic modifications of milk proteins. In: Fox P F (eds) *Developments in Dairy Chemistry – 4*, New York, USA.
- Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (1983)** http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid. Último acesso 13/10/2010
- O'Mahony F (1988)** Milk chemistry: milk constituents. In: O'Mahony F (ed) *Rural dairy technology. Experiences in Ethiopia*, Addis Ababa, Ethiopia
- Pardo M, López L, Caffini N, Natalucci C (2001)** Properties of a milk clotting protease isolated from fruits of *Bromelia balansae* Mez. *Biol. Chem.* 382:871–874
- Parodi P W (2007)** A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention *Curr Pharm Des.* 13(8):813–828
- Pecníková K, Tekel J, Fulmeková M (2002)** Infant formulas based on dried milk and risks of its contamination with residual pesticides. *Ceska Slov Fram* 51(2):68–72
- Pedrosa M, Pascual CY, Larco J, Martín Esteban M (2006)** Palatability of hydrolysates and other substitution formulas for cow's milk-allergic children: a comparative study of taste, smell, and texture evaluated by healthy volunteers. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 16(6):351–356
- Pereira A B, Caramelli D, Fox C L, et al., (2006)** The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *P Nat Acad Sci* 103(21):8113–8118
- Pina A S, Roque A C (2009)** Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensina-converting-enzyme. *J Mol. Recognit.* 22:162–168
- Platerink C, Janssen H, Haverkamp J (2008)** Application of at-line two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry for identification of small hydrophilic angiotensina I-inhibiting peptides in milk hydrolysates. *Anal Bioanal Chem* 391:299–307
- Potier M & Tomé D (2008)** Comparison of digestibility and quality of intact proteins with their respective hydrolyates. *J AOAC Int* 91(4):1002–1005
- Quirós A, Contreras M, Ramos M, Amigo L, Recio I (2009)** Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30:1848–1853
- Restani P, Gaiaschi A, Plebani A et al., (1999)** Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin Exp Allergy* 29(7):997–1004
- Rosendal A, Barkholt V (2000)** Detection of potentially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. *J Dairy Sci* 83:2200–2210
- Rozenfeld P, Docena G, Anón C, Fossati C (2002)** Detetion and identification of a soy component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin Exp Immunol* 130:49–58
- Saito T (2008)** Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Adv Exp Med Biol.* 606:295–317

- Sampson H A (1999)** Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103:717-728
- Sekiya S, Kobayashi Y, Kita E, Imamura Y, Toyama S (1992)** Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *J Nutr Food Sci* 45:513-17
- Setou M, Hayasaka T, Shimma S, Sugiura Y, Matsumoto M (2008)** Protein denaturation improves enzymatic digestion efficiency for direct tissue analysis using mass spectrometry. *App Surface Sci* 255:1555-1559
- Sigma quality control test procedure (2009)** Product information n° A-2580.http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/a2580.enz.par001.File.tem p/a2580enz.pdf. Último acesso 02/12/2009
- Simersky R, Swaczynova J, Morris D A, Franek M, Strand M (2007)** Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk. *Vet Med* 52(1):19-28
- Singh H, Fox P F (1987)** Heat stability of milk: influence of colloidal and soluble salts and protein modification on the pH-dependent dissociation of micellar κ -casein. *J Dairy Science* 54:523-534
- Smith E, Clegg R, Holt C (2004)** A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. *Int J Dairy Technol* 57:121-126
- Southward C R (1994)** Utilization of milk components: casein. In: Robinson R K (eds) *Modern dairy technology – Advances in milk processing*, 2^a ed., New York, USA.
- Stanley P, Galant M, Irene B, Haydik M (1991)** Allergenecity of cow's milk formula hydrolysates. *In vitro* evaluation by fast inhibition. *Pediatr Asthma Aller* 5(3):237-244
- Tavares J, Baptista J, Marcone M (1997)** Milk-coagulating enzymes of tuna fish waste as rennet substitute. *Int J Food Sci Nutr* 48:169-176
- Uhlig H (1998)** *Industrial enzymes and their applications*. New York, USA.
- Unileite (2009)** <http://www.unileite.pt/index.htm>. Último acesso 27/08/2009
- Uruakpa F O, Ismond M A, Akobundu E N (2002)** Colostrum and its benefits: a review. *Nutr Res* 22:755-767
- Vanhoof G, Cooreman W (1997)** Biochemical and pharmacologic properties: Bromelain. In: Lauwers A, Scharpé S (eds) *Pharmaceutical enzymes*, vol 84, pp 131-153. Marcel Dekker, New York.
- Vasbinder A, Rollema H, de Kruif C (2003)** Impaired rennetability of heated milk; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *J Dairy Sci*. 86:1548-1555
- Veloso A, Teixeira N, Ferreira I (2002)** Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *J Chromatogr A* 967:209-218

- Wal J M (2004)** Bovine milk allergenicity. *Ann Aller Asthma Immunol* 93 (5 Suppl 3): S2–11
- Walstra P & Jenness R (1984)** Protein composition of milk. In: Walstra P & Jenness R (eds.) *Dairy Chemistry and Physics*, Wiley, New York.
- Wu J, Ding X (2002)** Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int* 35:367–375
- Xiao R, Carter J A, Linz A L, Ferguson M, Badger T M, Simmen F A (2006)** Dietary whey protein lowers serum C-peptide concentration and duodenal SREBP-1c mRNA abundance, and reduces occurrence of duodenal tumors and colon aberrant crypt foci in azoxymethane-treated male rats. *J Nutr Biochem* 17(9):626–34
- Yada K, Yoshida K, Sakurai Y, Kimura M, Yasuhara H, Tanaka I, Yoshioka A (2008)** Casein hydrolysate formula-induced liver dysfunction in a neonate with non-immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18(1):67–70
- Zadow J G (1994)** Utilization of milk components: whey. In : Robinson R K (eds) *Modern Dairy Technology – Advances in milk processing*, 2^a ed., New York, USA.

Anexos

Anexo 1

Tabela 10 – Aminoácidos e abreviaturas (Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, 1983)

Aminoácidos	Abreviaturas	
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Ornitina	Orn	O
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Anexo 2

Tabela 11 – Péptidos obtidos de proteínas lácteas com actividade anti-hipertensiva e o seu potencial de inibição da ACE com valor de IC₅₀ inferior a 1000 µM (Hong et al., 2008)

Sequência de aminoácidos	IC ₅₀ (µM)
Péptidos com actividade inibitória da ACE derivados da α_{s1}-CN	
AYFYPE	106
QTQYDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	346
RPKHPIKHQ	13
FFVAPFPEVFGK	77
YKVPQL	22
YP	720
TTMPLW	16
FFVAP	6
PLW	36
LW	50
VAP	2
FVAP	10
Péptidos com actividade inibitória da ACE derivados da β-CN	
KYPVQPFTESQSLTL	93
KYPVQPFTESQSLTL	39
RDMPIQAF	209
YQQPVLGIPVRGPFPIIV	101
LLWQQPVLGPVRGPFPIIV	21
LPQNIPPLTQTPVVVPPFLEVMGVSK	25
LLYQQPVLGPVRGPFPIV	144
LSSSEESTRINKKIEKFQSEEQQQYEDELQDKIHFAQT	108
QSLVYFPFGPIPNLQPNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	
DELQDKIHFAQTQSLVYFPFGPIPN	4
KVLPVP	4.6
VYP	288
VYFPFG	221
YFPFGPIPN	15
IPP	5
TPVVVPPFLQP	749
VPP	9
LQSW	500
KVLPVP	5
AVPYPQR	15
VYFPFG	221
GKP	352
IPA	141

Tabela 11 (cont.)

Sequência de aminoácidos	IC ₅₀ (μM)
Péptidos com actividade inibitória da ACE derivados da β-CN (cont.)	
VYP	288
TPVVVPPFLQP	749
AVPYPQR	15
IYPFVEPI	8
IYPFVEPIP	12
LIYPFVEPIP	9
IYPFVEPIPY	20
YPFVEPIPY	20
PFVEPIPY	25
FVEPIPY	55
PIPY	30
Péptidos com actividade inibitória da ACE derivados da α₂-CN	
AMPKPW	580
MKPWIQPK	300
TKVIP	400
Péptidos com actividade inibitória da ACE derivados das proteínas do soro^a	
YGLF	733
IPA	141
FP	315
GKP	352

^aTestado em roedores com níveis induzidos de pressão sanguínea elevada

Anexo 3

Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD)
Junho de 2009

Análise Sensorial a um Produto Lácteo

Teste 1

			Amostra 2185						Amostra 1186		
Parâmetros	Sabor	Aspecto	Parâmetros	Sabor	Aspecto	Parâmetros	Sabor	Aspecto	Parâmetros	Sabor	Aspecto
Muito Desagradável			Muito Desagradável			Muito Desagradável			Muito Desagradável		
Desagradável			Desagradável			Desagradável			Desagradável		
Agradável			Agradável			Agradável			Agradável		
Muito Agradável			Muito Agradável			Muito Agradável			Muito Agradável		
Indiferente			Indiferente			Indiferente			Indiferente		

Observações:

Compraria alguma das amostras?

2185 1186 Ambas Nenhuma

Observações:

Obrigada pela sua colaboração!!