**Ana Catarina Sousa Pereira**

# Atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina de extratos peptídicos obtidos a partir da hidrólise do soro do queijo por cardosinas

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de Qualidade

Especialização em Água e Alimentos

**Trabalho realizado sob a orientação de:**

**Doutora Tânia Sofia Granja Tavares**

**e co-orientação de:**

**Prof. Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira**

**Dezembro, 2016**

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração do interessado, que tal se compromete.

Autora:

_____

Orientadora:

_____

Diretora do mestrado em Controlo de Qualidade:

_____

# Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível com a ajuda da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e de um núcleo de pessoas, às quais eu gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Dr.ª Tânia Tavares por tudo o que me ensinou, pela ajuda, dedicação, disponibilidade e paciência demostrada durante todo o ano. A sua orientação foi incansável e sem dúvida fundamental e motivacional para o desenvolvimento do meu trabalho. A sua exigência e preocupação ajudou-me a crescer profissionalmente e isso certamente, será importante para o meu futuro. Obrigada.

À Professora Dr.ª Isabel Ferreira, minha co-orientadora, agradeço o apoio e orientação cuidadosa durante todo o trabalho.

À Ana, que me acompanhou numa grande parte do trabalho e esteve sempre disposta a ajudar, o meu sincero obrigado. A tua ajuda, paciência e palavras de reconforto foram essenciais.

Aos colegas do Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, pelo bom ambiente de trabalho, companheirismo e sobretudo pela disponibilidade e ajuda prestada sempre que eu precisei. Foram essenciais no desenvolvimento do meu trabalho.

A todos os meus amigos, especialmente à Beatriz, Tânia e Teresa que caminham comigo nesta jornada um obrigada de coração. Sem vocês, tudo seria mais complicado. Obrigada pelas palavras amigas e ajuda sempre que eu precisei. Vocês têm a capacidade de alegrar os meus dias cinzentos e de fazer parecer tudo mais fácil. Foi uma longa caminhada e continuaremos sempre juntas até ao fim.

Às minhas primas, Ana e Susana por toda a vossa preocupação e palavras de reconforto. Obrigada por estarem sempre presentes e prontas a ajudarem.

Ao Rui, pela paciência, compreensão e carinho demonstrado nos últimos tempos.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais e irmãs que são em tudo o que faço os meus pilares e motivo de força maior. Obrigada pelo apoio, confiança, paciência e compreensão nestes últimos tempos mais difíceis e sobretudo pelo vosso amor incondicional que é a minha força para continuar sempre. Espero que tal como vocês são para mim o meu orgulho, eu vos possa orgulhar de alguma forma.

# Resumo

O soro, apesar de ser um subproduto da produção de queijo considerado poluente, devido ao seu elevado teor de proteína e lactose, trata-se de um suplemento proteico com diversas atividades funcionais comprovadas. Péptidos bioativos derivados das proteínas do soro têm suscitado um grande interesse por parte da comunidade científica e da indústria de lacticínios. A potencial atividade anti-hipertensiva de péptidos provenientes do soro tem sido avaliada, nomeadamente através do estudo da inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), a qual tem um papel fundamental na regulação da pressão arterial. Nas últimas décadas tem-se dado bastante enfoque à produção de concentrados peptídicos e até mesmo à descoberta de novos péptidos com atividade inibidora da ECA a partir de proteínas de diferentes fontes alimentares, embora ainda pouco se conheça sobre a biodisponibilidade destes péptidos.

O principal objetivo desta dissertação foi a produção de um concentrado peptídico (CPep) com atividade inibidora de ECA, através da hidrólise de concentrados proteicos de soro (CPS), usando um extrato de cardosina purificado a partir de um extrato aquoso comercial de *Cynara cardunculus*. O isolamento da cardosina foi executado em 2 fases: separação por pesos moleculares através de ultrafiltração membranar seguido por separação através de técnicas de cromatografia líquida utilizando uma coluna de troca iónica. As condições ótimas de hidrólise do CPS foram determinadas através do método de superfície de resposta, usando como funções objetivo o grau de hidrólise (GH) e a atividade inibidora da ECA, onde o tempo de hidrólise e a razão enzima/substrato foram usados como parâmetros. O modelo sugerido mostrou-se estatisticamente apropriado para descrever a atividade inibidora da ECA exibida pelos hidrolisados de CPS. As condições ótimas encontradas foram: 0,002 (m/m) para a razão enzima/substrato durante 7 h, a 55 °C e pH 5.2, sobre 40 g/L de substrato proteico. Tais condições ótimas conduziram a uma inibição da ECA em 50% ($IC_{50}$) de 115,2 ± 9,7 μg/mL para o hidrolisado total (CPSH); 22,6 ± 3,1 μg/mL para a fração <3 kDa do CPSH e 517,0 ± 66,2 μg/mL para fração >3 kDa do CPSH.

Em estudos de bioacessibilidade/biodisponibilidade, o CPep demonstrou exibir atividade inibidora da ECA.

**Palavras-chave:** Soro de queijo, péptidos bioativos, hidrólise, atividade inibidora da ECA, biodisponibilidade.

# Abstract

The whey, despite being a cheese production by-product regarded as polluting, because of its high protein and lactose content, is a protein supplement with proven functional activities. Bioactive peptides derived from whey proteins have raised great interest in the scientific community and dairy industry. The potential antihypertensive activity of peptides derived from whey have been evaluated, namely by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition, which plays a fundamental role in blood pressure regulation. In recent decades, it has been given enough attention to the production of peptide concentrates and even to the discovery of new peptides having ACE-inhibitory activity from proteins of different food sources, although little is known about the bioavailability of such peptides.

The main objective of this work was the production of a peptide concentrate (PepC) with ACE-inhibitory activity through whey protein concentrates (WPC) hydrolysis, using a purified cardosin extract obtained from a commercial aqueous extract of *Cynara cardunculus*. The isolation of cardosin was performed in two stages: separation by molecular weight through membrane ultrafiltration followed by chromatographic separation on an ion exchange column. The optimum WPC hydrolysis conditions were determined by response surface methodology, using degree of hydrolysis (DH) and ACE-inhibitory activity as objective function. The time of hydrolysis and the enzyme/substrate ratio were used as parameters. The suggested model was statistically appropriate to describe the ACE-inhibitory activity displayed by the WPC hydrolysates. The optimum conditions were: 0,002 (w/w) for the enzyme/substrate ratio during 7 h at 55 °C and pH 5.2, over 40 g/L protein substrate. Such optimum conditions led to a 50% ACE-inhibition (IC50) of 115.2 ± 9.7 μg/mL for the total hydrolyzate (CPSH); 22.6 ± 3.1 μg/mL for the fraction <3 kDa CPSH and 517.0 ± 66.2 μg/mL for fraction >3 kDa CPSH. Studies on bioaccessibility/bioavailability demonstrated that PepC displays ACE-inhibitory activity.

**Keywords:** Cheese whey, bioactive peptides, hydrolysis, ACE-inhibitory activity, bioavailability.

# Índice

Agradecimentos ..... iii

Resumo ..... iv

Abstract ..... v

Índice de tabelas ..... x

Lista de abreviaturas ..... xi

Nomenclatura de aminoácidos ..... xiv

Esquema do trabalho ..... xvi

Capítulo 1 – Introdução ..... xvi

1.1. Soro de queijo ..... 3

1.1.1. Composição do soro ..... 3

1.1.1.1. Lactose ..... 5

1.1.1.2. Proteínas do soro ..... 6

*1.1.1.1.1. β-Lactoglobulina* ..... 7

*1.1.1.1.2. α-Lactoalbumina* ..... 8

*1.1.1.1.3. Imunoglobulinas* ..... 10

*1.1.1.1.4. Albumina do soro* ..... 9

*1.1.1.1.5. Lactoferrina* ..... 8

*1.1.1.1.6. Lactoperoxidase* ..... 9

*1.1.1.1.7. Protease- peptonas* ..... 9

*1.1.1.1.8. Caseinomacropéptido* ..... 10

1.2. Produção do soro ..... 11

1.3. Aproveitamento do soro ..... 12

1.3.1. Possíveis aplicações do soro ..... 13

1.4. Proteínas do soro como fonte de ingredientes funcionais ..... 14

1.5. Hidrólise enzimática ..... 18

1.5.1. Enzimas coagulantes ..... 20

1.5.1.1. Enzimas coagulantes de origem animal/vegetal ..... 20

1.5.1.2. *Cynara cardunculus* ..... 21

1.6. Atividade anti-hipertensiva....22
1.6.1. Péptidos do soro com atividade anti-hipertenva....25
1.7. Biodisponibilidade....29
1.8. Métodos de análise, isolamento e purificação de proteínas e péptidos....32
1.8.1. Técnicas de separação por membranas....32
1.8.2. Técnicas de separação cromatográficas....34
Capítulo 2 – Materiais e Métodos....35
2.1. Preparação do substrato enzimático....36
2.1.1. Caracterização nutricional do extrato de coalho vegetal....36
2.1.2. Estabilidade enzimática do extrato de coalho vegetal....36
2.1.3. Extração e purificação das cardosinas....36
2.1.3.1. Determinação da atividade proteolítica....38
2.1.3.2. Determinação da atividade coagulante....39
2.2. Obtenção de concentrados peptídicos com atividade inibidora de ECA....39
2.2.1. Desenho experimental, modelação e otimização....39
2.2.1.1. Hidrólise enzimática....41
2.2.1.2. Determinação do grau de hidrólise....41
2.2.1.3. Avaliação da atividade inibidora da ECA....42
2.3. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade....43
2.3.1. Digestão e absorção *in vitro*....43
2.4. Tratamento estatístico....46
Capítulo 3 – Resultados e Discussão....47
3.1. Preparação do substrato enzimático....48
3.1.1. Caracterização nutricional do extrato de coalho vegetal....48
3.1.2. Estabilidade enzimática do extrato de coalho vegetal....48
3.1.3. Extração e purificação das cardosinas....49
3.1.3.1. Ultrafiltração membranar....50
3.1.3.2. Cromatografia líquida....51

*3.1.3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular* ..... 51

*3.1.3.2.2. Cromatografia de troca iónica* ..... 52

3.2. Obtenção de concentrados peptídicos com atividade inibidora de ECA ..... 56

3.2.1. Desenho experimental, modelação e otimização..... 56

3.2.1.1. Validação do modelo ..... 60

3.3. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade..... 61

Capítulo 4 – Conclusões ..... 64

Capítulo 5 – Perspetivas futuras..... 66

Capítulo 6 – Bibliografia..... 68

# Índice de figuras

**Figura 1 –** Reação do TNBS com grupos amino (Rutherford, 2010). .....20
**Figura 2 –** Reações catalisadas pela enzima conversora da angiotensina (ECA) e os seus efeitos fisiológicos (adaptado de Zaman *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2013). .....23
**Figura 3 –** Relação entre as técnicas de filtração por membrana (intervalo do tamanho do poro da membrana) e o tamanho relativo dos vários componentes do leite (adaptado de Alfa Laval/ Tetra Pak, 1995).....33
**Figura 4 –** Esquema representativo dos procedimentos (A e B) de ultrafiltração membranar efetuados.....37
**Figura 5 –** Reação catalisada pelo TNBS quando em contacto com grupos α-amina livres (Kale e Bajaj, 2010).....42
**Figura 6 –** Visualização geral do procedimento de digestão in vitro das diferentes amostras, assim como do estudo da absorção *in vitro* através de células Caco-2. .....44
**Figura 7 –** Perfil de eluição do extrato de cardo comercial onde foi recolhida a Fração 1 (F1), e de um padrão de pesos moleculares de proteína (a – albumina sérica bovina, b – β-lactoglobulina e c – mioglobina, num sistema de FPLC (coluna Superose 12 HR 10/30)..52
**Figura 8 –** Cromatogramas obtidos por FPLC (coluna Mono-Q HR 5/5), das frações A – F1-FPLC; B – F>50 kDa; C – F50-30 kDa e D – F>30 kDa.....53
**Figura 9 –** Gráficos de pareto padronizados apresentando o efeito de cada termo no modelo dividido pelo erro standard para 2 das 2 variáveis resposta e superfícies de resposta obtidas mediante o modelo calculado (apresentadas na Tabela 11) que dependem da relação enzima/substrato e o tempo de reação.....58
**Figura 10 –** Valores referentes aos índices de $IC_{50}$ das amostras dos hidrolisados do concentrado de proteínas do soro (CPSH) com cardosina A nas condições ótimas determinadas (fração total - CPSH, CPSH<3 kDa e CPSH>3 kDa). A atividade está expressa como $IC_{50}$ (concentração mínima necessária de proteína em $\mu$g/mL para inibir 50% da atividade da enzima).....60
**Figura 11 –** Valores referentes aos índices de $IC_{50}$ do concentrado de proteínas do soro (CPS) e Concentrado Peptídico (CPep) iniciais, após simulação da digestão e compartimento apical e basolateral das células Caco-2. A atividade está expressa como $IC_{50}$ (concentração mínima necessária de proteína em $\mu$g/mL para inibir 50% da atividade da enzima). .....62

# Índice de tabelas

**Tabela 1 –** Principais componentes do soro de queijo doce e ácido. (Adaptado de Jelen, 2011; Prazeres *et al.*, 2012). ..... 4

**Tabela 2 –** Composição típica do leite e do soro (Smithers *et al.*, 1996; Tecninvest, 2000; Akpinar-Bayizit *et al.*, 2009). ..... 5

**Tabela 3 –** Composição média do soro em vitaminas (Almeida *et al.*, 2001)**.** ..... 5

**Tabela 4 –** Parâmetros físico-químicos das proteínas do soro de acordo com McKenzey (Adaptado de Zydney, 1998; Madureira *et al.*, 2007). ..... 7

**Tabela 5 –** Principais caraterísticas da utilização do soro de queijo (adaptado de Alais, 1984). ..... 13

**Tabela 6 –** Composição dos principais tipos de soro em pó (% m/m) (Adaptado de Jelen, 2011). ..... 14

**Tabela 7 –** Funções biológicas das proteínas / péptidos do soro (adaptado de Madureira *et al.*, 2007). ..... 16

**Tabela 8 –** Vantagens e desvantagens dos dois tipos de hidrólise enzimática (Korhonen e Pihlanto, 2003, 2006). ..... 18

**Tabela 9 –** Características estruturais primárias de péptidos de soro com atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (ECA), e vetores de geração destes (Tavares, 2011). ..... 27

**Tabela 10 –** Métodos in vitro (Etcheverry *et al.*, 2012). ..... 31

**Tabela 11 –** Desenho da matriz experimental e resultados obtidos para as duas variáveis resposta estudadas, dependendo da relação enzima/substrato e tempo de reação. ..... 40

**Tabela 12 –** Composição nutricional do extrato de cardo comercial. ..... 48

**Tabela 13** – Atividade enzimática dos extratos de cardo comercial (ECC) líquido e liofilizado, com e sem remoção de sais minerais. ..... 49

**Tabela 14** – Atividade enzimática do extrato de cardo comercial (ECC) e das frações obtidas por ultrafiltração. ..... 50

**Tabela 15** – Atividade enzimática específica (atividade coagulante) das frações antes e após separação por coluna Mono Q. ..... 54

**Tabela 16** – Atividade enzimática específica (atividade proteolítica) das frações antes e após separação por coluna Mono Q. ..... 54

**Tabela 17** – Relação entre a atividade coagulante e a atividade proteolítica das frações resultantes da separação por coluna Mono Q e da fração injetada. ..... 55

**Tabela 18 –** Coeficientes de regressão estimados para os termos do modelo e valores estatísticos para avaliar o ajuste, usando regressão linear múltipla (RLM). ..... 59

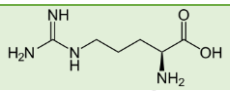
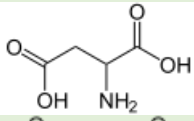
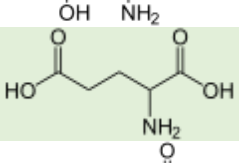
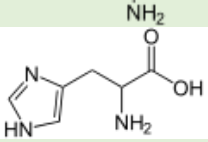
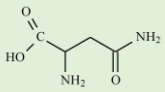
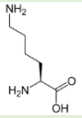
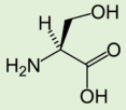
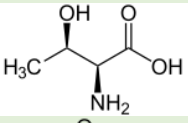
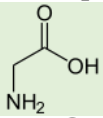
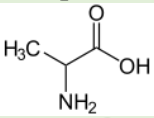
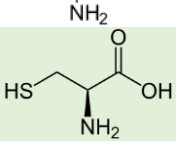
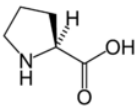
**Tabela 19 –** Condições ótimas (máximo grau de hidrólise, máxima atividade inibidora de ECA (fração <3 kDa), determinada por programa estatístico (usando o modelo ajustado da Tabela 11). ..... 59

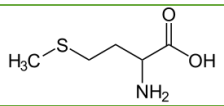
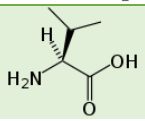
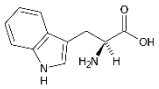
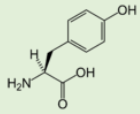
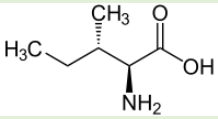
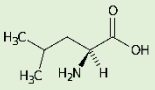
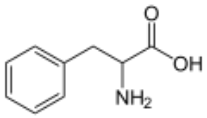
# Lista de abreviaturas

| | |
|---|---|
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CMP | Caseinomacropéptido |
| CN | Caseína |
| CPep | Concentrado peptídico |
| CPP | Caseinofosfopéptido |
| CPS | Concentrado proteico de soro |
| CPSH | Hidrolisados do concentrado de proteínas do soro |
| DCC | Desenho composto central |
| DMEM | Meio de eagle modificado por dulbecco |
| DWP | Soro desmineralizado |
| E/S | Enzima/substrato |
| ECA | Enzima conversora da angiotensina |
| ECC | Extratos de cardo comercial |
| FAPGG | Furanacriloil-L-fenil-alanilglicilglicina |
| FGS | Fluido gástrico simulado |
| FIS | Fluido intestinal simulado |
| FPLC | Cromatografia líquida para separação de proteínas |
| FSS | Fluido salivar simulado |
| FUFOSE | Entidade para a ciência dos alimentos funcionais na Europa |
| GH | Grau de hidrólise |
| HBSS | Solução-tampão salina de Hank |
| HHL | Hipuril-L-histidil-L-leucina |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| HPLC-MS/MS | Cromatografia liquida acpolada a espectroscopia de massa |
| $IC_{50}$ | Concentração para inibir 50% de atividade |
| Igs | Imunoglobulinas |
| IPS | Isolado proteico de soro |
| LF | Lactoferrina |
| LP | Lactoperoxidase |
| MS | Espectroscopia de massa |
| OAA/FA | Organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura |
| OPA | *o*-oftaldialdeído |
| $PP_S$ | Proteose-peptonas |

| | |
|---|---|
| RET | Resistência elétrica transepitelial |
| RLM | Regressão linear múltipla |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| RP-HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa |
| SHR | Ratos espontaneamente hipertensos |
| TNBS | Ácido 2,4,6-trinitrobenzoico |
| TPP | Proteose-peptona total |
| α-La | α-Lactoalbumina |
| β-Lg | β-Lactoglobulina |

## **Nomenclatura de aminoácidos** (ordenados pelo aumento da hidrofobicidade)

| Nome | Fórmula química | Código de 1 letra | Código de 3 letras | Peso molecular (Da) | Fórmula estrutural |
|---|---|---|---|---|---|
| Arginina | $C_6H_{14}N_4O_2$ | R | Arg | 174.2 |  |
| Aspartato | $C_4H_7NO_4$ | D | Asp | 133.1 |  |
| Glutamato | $C_5H_9NO_4$ | E | Glu | 147.1 |  |
| Histidina | $C_6H_9N_3O_2$ | H | His | 155.2 |  |
| Asparagina | $C_4H_8N_2O_3$ | N | Asn | 132.1 |  |
| Lisina | $C_6H_{14}N_2O_2$ | K | Lys | 146.2 |  |
| Serina | $C_3H_7NO_3$ | S | Ser | 105.1 |  |
| Treonina | $C_4H_9NO_3$ | T | Thr | 119.1 |  |
| Glicina | $C_2H_5NO_2$ | G | Gly | 75.1 |  |
| Alanina | $C_3H_7NO_2$ | A | Ala | 89.1 |  |
| Cisteína | $C_3H_7NO_2S$ | C | Cys | 121.2 |  |
| Prolina | $C_5H_9NO_2$ | P | Pro | 115.1 |  |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Metionina | $C_5H_{11}NO_2S$ | **M** | **Met** | **149.2** |  |
| Valina | $C_5H_{11}NO_2$ | V | Val | 117.2 |  |
| Triptofano | $C_{11}H_{12}N_2O_2$ | W | Trp | 204.2 |  |
| Tirosina | $C_9H_{11}NO_3$ | Y | Tyr | 181.2 |  |
| Isoleucina | $C_6H_{13}NO_2$ | I | Ile | 131.2 |  |
| Leucina | $C_6H_{13}NO_2$ | L | Leu | 131.2 |  |
| Fenilalanina | $C_9H_{11}NO_2$ | F | Phe | 165.2 |  |

## Preparação do extrato de cardosina

- Caracterização nutricional do extrato de cardo
- Impacto do teor de sais e do processo de liofilização na estabilidade das enzimas
- Extração das cardosinas

## Produção do CPep

- Determinação das condições ótimas de hidrólise

## Estudos de biodisponibilidade do CPep

# Capítulo 1 – Introdução

1.1. Soro de queijo

1.2. Produção de soro

1.3. Aproveitamento do soro

1.4. Proteínas do soro como fonte de ingredientes funcionais

1.5. Hidrólise enzimática

1.6. Atividade anti-hipertensiva

1.7. Biodisponibilidade

1.8. Métodos de análise, isolamento e purificação de proteínas e péptidos

O mercado dos alimentos funcionais encontra-se em expansão contínua na Europa, devido a uma crescente preocupação dos consumidores pelo binómio alimentação e saúde. Os alimentos funcionais apresentam a mesma aparência e efeito nutritivo dos convencionais. No entanto, devido à presença ou adição de certos ingredientes trazem benefícios adicionais, nomeadamente na prevenção e controlo das doenças tais como a obesidade, acidentes vasculares cerebrais, hipertensão arterial, cancro e diabetes (Korhonen e Pihlanto, 2003; Komatsu *et al.*, 2008; Ozen *et al.*, 2012, 2014). A definição de alimento funcional proposta pela FUFOSE (Entidade para a ciência dos alimentos funcionais na europa) engloba três aspetos importantes: (1) o efeito funcional ser diferente do nutritivo, (2) o benefício apresentado ser cientificamente fundamentado e (3) apresentar uma melhoria das funções fisiológicas ou a redução do risco de desenvolvimento de um processo patológico. Estes alimentos/ingredientes são provenientes de variadíssimas fontes, tais como: os cereais, o café, o chá, o vinho, os lacticínios, o chocolate, a carne, o peixe, os ovos, entre outros (Ozen *et al.*, 2012).

Os produtos lácteos são comprovadamente alimentos funcionais, uma vez que para além do seu valor nutritivo, são fonte de numerosos péptidos que exibem distintas propriedades biológicas, sendo modeladores de vários processos metabólicos do organismo (Prates e Mateus, 2002; Tsutsumi e Tsutsumi, 2014; Rosolen *et al.*, 2015). A maioria destes péptidos estão inativos e são apenas ativados após serem libertados, normalmente, durante a digestão gastrointestinal ou no processamento dos alimentos (Korhonen e Pihlanto, 2003, 2006; Choi *et al.*, 2012). Evidências científicas revelam que as proteínas do soro do queijo contêm diversas sequências peptídicas suscetíveis de desempenhar funções fisiológicas cruciais e modular alguns processos regulatórios; algumas dessas atividades incluem funções antimicrobianas, anti-hipertensivas, antitrombóticas, opióides e anti-cancerígenas, bem como efeitos benéficos sobre a função digestiva (Prates e Mateus, 2002; Akpinar-Bayizit *et al.,* 2009).

O soro é considerado uma fonte importante de ingredientes funcionais, devido ao seu elevado valor biológico, à sua composição nutricional, às propriedades funcionais diferenciadas, ao grande volume de produção, e ao facto de apresentar um perfil aromático inerte. O soro apresenta um elevado potencial na indústria de lacticínios e farmacêutica, podendo ser usado como substituto de ingredientes menos desejáveis e desta forma ajudar os responsáveis pelo desenvolvimento e/ou reengenharia de fórmulas. Sendo assim, o soro é considerado um valioso subproduto (Prates e Mateus, 2002; Jeewanthi *et al.*, 2015).

Esta dissertação teve como principal objetivo a produção de um CPep com atividade inibidora de ECA, através da hidrólise de CPS, usando um extrato de cardosina purificado obtido a partir de um extrato aquoso comercial de *C. cardunculus*. Desta forma, alguns

objetivos secundários foram delineados: i) caracterização nutricional de um extrato aquoso comercial de *C. Cardunculus;* ii) estudo do impacto do teor de sais minerais e do processo de liofilização na estabilidade das enzimas presentes no extrato de coalho vegetal; iii) obtenção de um extrato de cardosina purificado através do extrato aquoso comercial de *C. Cardunculus*; iv) determinação das condições ótimas de hidrólise para a obtenção de CPep com atividade inibidora da ECA obtido a partir de CPS via extrato de cardosina purificada; v) produção do CPep; e vi) estudos da bioacessibilidade/biodisponibilidade do CPep com atividade inibidora da ECA.

## 1.1. Soro de queijo

Na indústria de laticínios, o termo soro é usado para definir o líquido esverdeado que permanece em solução após a precipitação das caseínas (formação da coalhada) durante o fabrico de queijo ou produção de caseínas (Almeida *et al.*, 2001; Akpinar-Bayizit *et al.*, 2009*;* Athira *et al.*, 2014; Parashar *et al.*, 2015).

A produção de queijo é iniciada com o processo da formação da coalhada induzido pela acidificação do leite através da ação bacteriana, da plasmina presente no leite, dos coalhos de origem animal/vegetal ou de preparações enzimáticas que são adicionadas (Sousa *et al.*, 2001). Trata-se da passagem do leite do estado físico líquido para gelatinoso e tem como princípio, concentrar a proteína do leite, retendo também a gordura. A descoberta deste fenómeno resultou da conjugação aleatória de múltiplos fatores. De acordo com Fox *et al.* (2000), antes da criação da cerâmica, no período 5 000 a.C., o armazenamento do leite era realizado em peles ou em estômagos de animais abatidos. Ao não ser ingerido de imediato e deixado em repouso o leite sofria a ação das bactérias e das enzimas gástricas que o convertiam numa massa sólida e numa aguadilha refrescante própria para consumo. Este terá sido o primeiro contacto humano com a coalhada e o soro do leite.

### 1.1.1. Composição do soro

Com a produção de queijo, obtém-se o seu subproduto – soro de queijo, também denominado de soro de leite, sendo que, do ponto de vista industrial existem dois tipos de soro; o soro "ácido" (pH <5,1) e o soro "doce" (pH> 5,6), classificados pela sua acidez ou pelo conteúdo em ácido láctico (Oliveira *et al.,* 2012*)*. No caso de a coagulação ser realizada pela adição de ácidos orgânicos diretamente ao leite o soro resultante denomina-se de soro "ácido", sendo o subproduto do fabrico de caseína alimentar ou queijo. De outro modo, quando a coagulação é realizada por ação de enzimas proteolíticas, o soro resultante é denominado de soro "doce", sendo o resultado da produção de queijo (Jelen, 2003; Panesar

*et al.*, 2007). Os dois tipos de soro resultam de tecnologias diferentes, no entanto possuem composição semelhante, sendo o principal componente a água (93 a 94%), seguida da lactose (4,6 a 6,2%) e das proteínas (0,6 a 1%) (Tabela 1). Contudo, o soro "ácido" possui um teor de lactose mais baixo, pois a coagulação é realizada à custa da produção de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido lático, resultante da utilização da lactose pelos microrganismos (Jelen, 2011). A nível dos constituintes minerais também existem diferenças, uma vez que o soro "ácido" possui um teor de cálcio maior, dado que o fosfato de cálcio, presente nas micelas de caseína, se torna solúvel, a pH baixo, passando para a fração do soro (Jelen, 2011).

**Tabela 1 –** Principais componentes do soro de queijo doce e ácido. (Adaptado de Jelen, 2011; Prazeres *et al.*, 2012).

| | Soro "doce" (% m/v) | Soro "ácido" (% m/v) |
|---|---|---|
| **Sólidos totais** | 6,3 – 7 | 6,3 – 7 |
| **Lactose** | 4,6 – 6,2 | 4,4 – 4,6 |
| **Proteína** | 0,6 – 1 | 0,6 – 0,8 |
| **Ácido láctico** | 0,2 | 0,64 |
| **Cálcio** | 0,04 – 0,06 | 0,12 – 0,16 |
| **Fósforo** | 0,1 – 0,3 | 0,2 – 0,45 |

O aspeto do soro é influenciado pelo tipo e concentração de proteína e essencialmente pelo teor em riboflavina (vitamina que confere ao soro uma cor esverdeada). No entanto, o soro pode apresentar uma tonalidade amarela, devido à coloração durante o fabrico de queijo. A turbidez deve-se à presença de pequenas quantidades de caseína (Jelen, 1992).

Apesar de se tratar de um subproduto da indústria de laticínios, o soro possui um elevado valor nutritivo, uma vez que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite (Panesar *et al.*, 2007) (Tabela 2). O leite é reconhecidamente uma excelente fonte de proteínas, cerca de 3,6% da sua constituição são proteínas (Fennema, 2000; Miller *et al.*, 2000; Tsutsumi e Tsutsumi, 2014), sendo que 80% são caseínas e 20% proteínas do soro (grupo heterogéneo de proteínas).

**Tabela 2 –** Composição típica do leite e do soro (Smithers et al., 1996; Tecninvest, 2000; Akpinar-Bayizit et al., 2009).

| | Leite (% m/m) | Soro (% m/m) |
|---|---|---|
| **Proteína** | 3,6 | 0,65 – 1,05 |
| **Gordura** | 3,7 | 0,05 – 0,63 |
| **Cinzas** | 0,7 | 0,37 – 0,95 |
| **Lactose** | 4,9 | 4,5 – 5,3 |
| **Sólidos totais** | 12,8 | 6,2 – 7,3 |

O soro apresenta mais de 99% da lactose do leite, cerca de 20% das proteínas e componentes menores, como vitaminas hidrossolúveis (Tabela 3), sais minerais, gordura e oligoelementos (Seo *et al.*, 2015). Os sais minerais incluem NaCl e KCl (mais de 50%), os sais de cálcio (principalmente fosfato) e outros. Além destes nutrientes, o soro contém ácido lático e ácido cítrico, compostos azotados não proteicos tais como a ureia e ácido úrico (Amado *et al.*, 2015; Parashar *et al.*, 2015).

**Tabela 3 –** Composição média do soro em vitaminas (Almeida *et al.*, 2001)**.**

| Vitaminas | µg soro |
|---|---|
| **B6** | 4,0 |
| **B12** | 0,021 |
| **Riboflavina** | 23,4 |
| **Niacina** | 9,6 |
| **Biotina** | 0,37 |
| **Ácido fólico** | 0,9 |
| **Ácido pantoténico** | 47,3 |
| **Ácido ρ- aminobenzóico** | 10,0 |

A composição do soro sofre ligeiras alterações com o tipo de tratamento a que o leite é submetido (aquecimento, centrifugação, homogeneização); com o processo de fabrico de queijo ou caseínas e com o tratamento que o soro sofre após estar separado do coalho (pasteurização, pré-concentração e remoção de partículas de caseína) (Polat, 2009).

#### 1.1.1.1. Lactose

A lactose é o principal hidrato de carbono do leite de todos os mamíferos, incluindo animais de criação que produzem leite. Está presente no leite e no soro, em média 5% no estado molecular em solução, com partículas de diâmetros inferiores a 1 ηm. O leite humano contém aproximadamente 7% de lactose, enquanto que o leite de ruminantes domésticos, que são parte da alimentação humana, contém aproximadamente 5%. No soro, a lactose é o hidrato de carbono que existe em maior concentração, apresentando um valor médio entre 45 a 50 g/L, no caso do soro de vaca, ovelha e cabra (Walstra, 2001). É formada dentro do

aparelho de Golgi das células epiteliais das glândulas mamárias pela condensação de dois monossacáridos, uma molécula de D-glicose e uma de molécula de β-D-galactose por ação da enzima lactose sintetase. O grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, ficando livre para reagir com agentes oxidantes, sendo considerado um açúcar redutor (Becker, 2009; Kuhn e White, 2009).

A lactose para ser digerida e absorvida a partir do sistema digestivo, é hidrolisada no intestino delgado de mamíferos lactentes em β-D-glucose e β-D-galactose pela enzima lactase (β-D-galactosidase; β-D-galactósido galactohydrolase), secretada pelas vilosidades das células epiteliais (Silanikove e Shapiro, 2012). A maioria da população Asiática e Africana, deixa de produzir lactase após o desmame e, como resultado tornam-se intolerantes à lactose. Portanto, não é surpreendente, que cerca de 75% dos adultos da população mundial seja intolerante à lactose. Algumas populações, no entanto, têm desenvolvido persistência à lactose, em que a produção de lactase continua na idade adulta (Silanikove *et al.*, 2015).

#### 1.1.1.2. Proteínas do soro

As proteínas do soro representam 20% das proteínas totais leite e são moléculas globulares, com uma estrutura secundária predominantemente constituída por α-hélices (Madureira *et al.*, 2010). Encontram-se em solução, sob a forma de moléculas ou de agregados moleculares muito pequenos, com um diâmetro que pode variar entre 3 a 6 nm, ligando alguns contra-iões e uma pequena quantidade de água (Walstra, 2001).

Os principais componentes das proteínas do soro, por ordem de abundância são, a β-lactoglobulina (β-Lg), a α-lactoalbumina (α-La), as imunoglobulinas (Igs), a albumina sérica bovina (BSA), a lactoferrina (LF) e a lactoperoxidase (LP), bem como outros compostos proteicos menos abundantes, tais como o caseinomacropéptido (CMP) (Madureira *et al.*, 2007; Akpinar-Bayizit *et al.*, 2009; Madureira *et al.*, 2010; Tsutsumi e Tsutsumi, 2014; Jeewanthi *et al.*, 2015). A α-La e a β-Lg perfazem entre 70 a 80% das proteínas do soro (Lucema *et al.*, 2006). Estas proteínas são sintetizadas ou nas glândulas mamárias (β-Lg e a α-La), ou circulam no sangue (LF e a LP). Do mesmo modo que as caseínas as proteínas do soro também apresentam polimorfismo genético. Conhecem-se três variantes genéticas da α-La (A, B e C) e pelo menos doze para a β-Lg (A, B, C, D, DR, DYAK/E, F, G, H, I, W e X). Apresentam uma composição em aminoácidos muito diferente das caseínas, isto é, têm uma menor quantidade de Glu e Pro, e são ricas em aminoácidos com grupos de enxofre (Cys e Met). Para além disso, a α-La contém importantes quantidades de Trp. As proteínas do soro desnaturam pelo calor, são não fosforiladas, insensíveis ao $Ca^{2+}$ e sofrem uma ligação intramolecular como resultado da formação de

pontes dissulfureto entre os grupos tiol das cisteínas, ficando os grupos hidrofóbicos fechados no interior da molécula (Zydney, 1998). A Tabela 4 apresenta alguns parâmetros físico-químicos dos principais componentes das proteínas do soro.

**Tabela 4 –** Parâmetros físico-químicos das proteínas do soro de acordo com McKenzey (Adaptado de Zydney, 1998; Madureira *et al.*, 2007).

| Proteínas | Concentração (g/L) | Massa molecular (kDa) | Resíduos de aminoácidos |
|---|---|---|---|
| **β-lactoglobulina** | 1,3 | 18 | 162 |
| **α-lactoalbumina** | 1,2 | 14 | 123 |
| **Imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM)** | 0,7 | 25 (cadeia leve) + 50 – 70 (cadeia pesada) | Variável |
| **Albumina do soro** | 0,4 | 66 | 582 |
| **Lactoferrina** | 0,1 | 80 | 690 |
| **Lactoperoxidase** | 0,03 | 70 | 612 |
| **Protease – peptona** | 0,5 | 4-20 | * |
| **Caseinomacropéptido** | * | 7 | * |

* - Falta de informação na bibliografia

#### *1.1.1.1.1. β-Lactoglobulina*

A β-Lg é a proteína predominante no soro (Tabela 4), representando mais de metade do conteúdo proteico do mesmo (Kontopidis *et al.*, 2004; Madureira *et al.*, 2010; Creamer *et al.*, 2011; Tsutsumi e Tsutsumi, 2014). Esta proteína é sintetizada nas glândulas mamárias da maior parte dos mamíferos, estando ausente em algumas espécies, designadamente em grupos dos roedores, lagomorfos e no Homem (Kontopidis *et al.*, 2004). Possui diversas variantes, sendo a mais comum a β-LgA (Madureira *et al.*, 2007; Creamer *et al.*, 2011). É constituída por uma cadeia polipeptídica única, composta por 162 aminoácidos, conferindo-lhe uma massa molecular de 18 kDa (Tabela 4), na sua forma nativa (Farrell *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Dependendo do pH e da temperatura, esta proteína pode apresentar diferentes estruturas quaternárias, sendo encontrada sob a forma de octómero (pH entre 5,2 e 3,5), monómero (pH abaixo de 3 e acima de 8), mas mais comumente sob a forma dimérica (entre pH 7 e 5,2) (Madureira *et al.*, 2007; Jeewanthi *et al.*, 2015).

#### *1.1.1.1.2. α-Lactoalbumina*

A α-La é uma pequena e compacta metaloproteína e é a segunda proteína mais abundante no soro (Tabela 4), representando cerca de 20% do seu teor proteico total (Permyakov e Berliner, 2000; Madureira *et al.*, 2007). Possui 123 resíduos de aminoácidos, o que lhe confere uma massa molecular de 14 kDa (Tabela 4), sendo sintetizada integralmente nas glândulas mamárias, onde exerce a sua atividade no processo de síntese da lactose, em conjunto com a galactosiltransferase (Permyakov e Berliner, 2000; Brew, 2011). Embora a sua sequência possua um grau elevado de homologia com a família das lisozimas, a α-La possui um ião $Ca^{2+}$ que intervém na manutenção da estrutura da proteína, bem como na sua função (Brew, 2011). Contudo, quando os valores de pH do meio são baixos (cerca de 3,5), o ião $Ca^{2+}$ é libertado por uma alteração reversível da conformação da proteína (Permyakov e Berliner, 2000).

A α-La tem um elevado conteúdo do aminoácido Trp (4 resíduos por mol), que é precursor da niacina (Miller *et al.*, 2000). Trata-se de uma proteína rica em aminoácidos sulfurados, principalmente Cys (4 pontes dissulfureto intramoleculares por mol) e Met. Todos os resíduos de aminoácidos sulfurados estão envolvidos em pontes dissulfureto intramolecular, que ligam os resíduos de Cys 6-120, 28-111, 61-77 e 73-91 (Fox e McSweeney, 1998). Contém uma grande quantidade dos resíduos L-Ile, L-Leu e Val, os quais estão presentes nas células musculares, impedindo a síntese proteica (Walzem *et al.*, 2002).

Relativamente à estrutura terciária, a α-La é uma proteína globular compacta constituída por 26% de α-hélice, 14% de estrutura folha β e 60% de outras estruturas (Fox e McSweeney, 1998). A nível da sequência de aminoácidos, o grau de homologia entre as proteínas humana e bovina é de cerca de 76% (Chatterton *et al.*, 2006). Contudo, o caso clínico reportado por Gall *et al.* (1996) mostra que a α-La de leite de ovelha desencadeia respostas imunitárias em alguns indivíduos, provando ser alergénica.

#### *1.1.1.1.3. Imunoglobulinas*

As Igs ou anticorpos são produzidas pelos linfócitos B. A sua estrutura é formada por uma ou mais unidades básicas, sendo estas compostas por duas cadeias leves (25 kDa) e duas cadeias pesadas (53 kDa) (Tabela 4). No leite bovino, existem essencialmente três classes de Igs: IgG, IgM e IgA (Korhonen *et al.,* 2000; Madureira *et al.*, 2007; Tsutsumi e Tsutsumi, 2014), sendo a $IgG_1$ a principal imunoglobulina presente no leite bovino e no colostro, enquanto no leite humano é a IgA (Nakai e Modler, 1996). Na vaca, durante as últimas semanas de gravidez, ocorre a acumulação seletiva de Igs a partir do sangue para o

colostro. As Igs nos primeiros dois dias de lactação podem atingir os 200 g/L no colostro (70 a 80% do total de proteínas) caindo a sua concentração, abruptamente, para valores entre 0,7 e 1,0 g/L no leite maduro (Korhonen *et al.* 2000).

#### *1.1.1.1.4. Albumina do soro*

A albumina do soro está presente predominantemente no sistema circulatório, contudo também se encontra no leite, dado que a sua passagem se dá através dos capilares sanguíneos (Wynn *et al.*, 2011). Possui 582 resíduos de aminoácidos, que lhe conferem um peso molecular de cerca de 66 kDa (Tabela 4) (Madureira *et al.*, 2007).

Devido ao seu tamanho e estrutura complexa, tem a capacidade de se ligar a ácidos gordos livres e outros lípidos, bem como a compostos aromáticos (Madureira *et al.*, 2007), um recurso que é severamente prejudicado após a desnaturação.

#### *1.1.1.1.5. Lactoferrina*

A LF é uma glicoproteína monomérica sintetizada pelos neutrófilos. Possui uma cadeia de 690 aminoácidos e, dependendo do nível de glicosilação e da espécie considerada, o seu peso molecular está compreendido entre os 80 e os 84 kDa (Tabela 4). O seu ponto isoeléctrico é de 9,4 (Simpson e Nicholas 2002, Madureira *et al.*, 2007; Korhonen e Marnila, 2011). A sua alta afinidade pelo ferro e a capacidade de ligação da extremidade N-terminal fortemente catiónica são características estruturais responsáveis pelas várias atividades biológicas da LF (Steijins e van Hooijdonk, 2000, Tsutsumi e Tsutsumi, 2014).

#### *1.1.1.1.6. Lactoperoxidase*

A LP é uma glicoproteína, constituída por uma única cadeia polipeptídica contendo cerca de 612 resíduos de aminoácidos, o que lhe confere um peso molecular de 70 kDa a 78 kDa (Tabela 4), dependendo do seu nível de glicosilação. Tal como a LF, é uma proteína alcalina e o seu ponto isoelétrico é de 9,6 (Kussendrager e van Hooijdonk, 2000; Boots e Floris, 2006; Singh *et al.*, 2008).

A LP está presente nas glândulas mamárias, salivares e lacrimais dos mamíferos e nas suas respetivas secreções, ou seja no leite, saliva e lágrimas (Kussendrager e van Hooijdonk, 2000; Montiel *et al.*, 2012). É a enzima mais abundante e mais estável ao calor presente no soro de queijo, sendo por isso utilizada como índice da eficácia da pasteurização do leite cru (Shakeel-ur-Rehman e Farkye, 2003; Tsutsumi e Tsutsumi, 2014). Estudos demonstraram que a LP é apenas parcialmente inativa através de uma pasteurização curta

a 74 °C (Wolfson e Sumner, 1993). Marks *et al.* (2001) confirmaram ainda que a LP mantém a sua atividade durante a pasteurização normal (63 °C durante 30 min ou 72 °C durante 15 s), mas é destruída pela pasteurização a 80 °C durante 4 s (Seifu *et al.*, 2005).

#### *1.1.1.1.7. Protease-peptonas*

Estudos realizados por Andrews e Alichanidis (1983) identificaram 38 péptidos da fração proteica do soro resistentes ao aquecimento (95-100 °C durante 30 min) e insolúveis em ácido tricloroacético (8 a 12%), características químicas que definem as proteose-peptonas. Muitos destes péptidos resultam da proteólise das caseínas, nomeadamente da β-caseína, por ação de proteases ou da plasmina do leite (Andrews e Alichanidis, 1983; Mulvihill e Donovan 1987).

A fração de proteose-peptona total (TPP) no leite bovino representa aproximadamente 10% da proteína total do soro (Tabela 4); sendo determinada a partir da fração proteica solúvel, após aquecimento a 95 °C durante 30 min, seguido por acidificação para um pH de 4,6 (Alais, 1984). A fração TPP é muitas vezes dividida em dois grupos principais: o primeiro que inclui as proteose-peptonas ($PP_S$) originadas da hidrólise da caseína, sendo os seus principais componentes designados como componentes 5 (PP5), 8 rápido (PP8 rápido) e 8 lento (PP8 lento), de acordo com as suas mobilidades electroforéticas (Alais, 1984; Innocente *et al.*, 1998).

#### *1.1.1.1.8. Caseinomacropéptido*

A hidrólise da κ-caseína do leite durante o fabrico do queijo, reação catalisada pela quimosina, liberta a *para*-κ-caseína que permanece na coalhada e um péptido terminal de 64 aminoácidos (8 kDa) com cerca de 10% do seu peso em sacarídeos, que escorre com o soro, o CMP. Este péptido, inexistente no soro ácido, representa cerca de 15 a 20% do total das proteínas do soro doce (Brody, 2000). O CMP é também libertado no estômago por ação da pepsina gástrica sobre a κ-caseína após a ingestão de leite ou iogurte (Ledoux *et al.,* 1999). Trata-se de um constituinte de elevado valor no que respeita a propriedades funcionais e valor nutritivo específico (Tolkach e Kulozik, 2005).

O CMP pode existir sob várias formas, dependendo da extensão das modificações pós-trascripcionais; na forma glicosilada através de uma ponte *O*-glicosídica, fosforilada, por fosforilação de um resíduo de Ser, assim como pode apresentar variantes genéticas. É de salientar que as modificações pós-trascripcionais da κ-caseína se encontram exclusivamente na porção CMP da molécula. A sequência de aminoácidos para cada espécie

de CMP está definida. São caracterizadas pela ausência de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, e Tyr) e Arg, e por uma grande quantidade de aminoácidos acídicos e hidroxílicos. Os CMPs caprinos e ovinos apresentam um elevado nível de homologia. Ao comparar com a sequência do CMP bovino, no CMP ovino e caprino há duas inserções de 17 e 19 substituições respetivamente (Manso e Lopes-Fandiño, 2004).

## 1.2. Produção do soro

Com o avanço da tecnologia, a produção de queijo passou de um processo tradicional, onde pequenas quantidades de soro eram produzidas, para um processo industrial com a obtenção diária de milhares de litros de soro (Almeida *et al.,* 2000). Na produção de um quilo de queijo são necessários 10 L de leite sendo obtidos 9 L de soro como subproduto.

Segundo a organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura (OAA/FAO), a produção mundial de queijo desde 2000 até 2012, aumentou em cerca de 4 milhões de toneladas (24%), sendo os três principais produtores os Estados Unidos, a Alemanha e a França, com uma produção de 5, 2 e 2 milhões de toneladas respetivamente. Neste período de tempo, dos 753 milhões de toneladas de leite produzidos, cerca de 15% foi utilizado para a produção de 21 milhões de toneladas de queijo. O leite de vaca é o leite que possui maior expressão neste sector; no entanto, o de cabra e de ovelha também estão intrinsecamente associados com a produção de queijos tradicionais e de leites fermentados (Fox *et al.*, 2000). Em Portugal, no ano de 2014, cerca de 20% da produção total de leite (2 milhões de toneladas) foi utilizado para produzir 74 mil toneladas de queijo (OAA/FAO, 2014). Deste modo, sendo a indústria queijeira, em termos de volume, a mais relevante ao nível do fabrico de produtos fermentados, a quantidade de soro produzido é geralmente superior às necessidades do mercado (Hutkins, 2006); o que implica que o soro de queijo seja um dos principais efluentes do setor de lacticínios (Smithers, 2008).

A produção de queijo está projetada para alcançar 25,3 milhões de toneladas métricas em 2023, resultando numa produção colossal de soro (Parashar *et al.*, 2015). Por cada litro de soro são desperdiçados cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteínas com elevado valor nutricional e funcional (Tecninvest 2000; Almeida *et al.,* 2001; Akpinar-Bayizit *et al.*, 2009; Parashar *et al.*, 2015). Com uma produção mundial estimada em torno de 180 a 190 $\times 10^6$ toneladas/ano das quais 40 $\times 10^6$ toneladas/ano na união europeia (Koller *et al.*, 2005), apenas cerca de 50% do soro é processado (Giraldo-Zuniga *et al.*, 2002; Baldasso *et al.*, 2011). Desse montante, cerca de 50% é usado diretamente na forma líquida, 30% sob a forma de soro em pó, 15% em lactose e nos seus derivados e o restante como concentrados

proteicos (Spalatelu, 2012). Em 2014, a nível mundial, foi estimada a produção de produtos à base de soro em 5,6 milhões de toneladas, dos quais o principal produto foi o soro em pó. Torna-se pertinente encontrar novas formas de usar o soro de queijo, sendo a sua valorização uma solução eficaz e sustentável para reduzir a carga poluente (Parashar *et al.*, 2015).

## 1.3. Aproveitamento do soro

O soro foi considerado ao longo de vários anos um resíduo que a indústria de lacticínios tinha de eliminar, da forma mais económica possível, dada a sua reduzida valorização. Neste sentido, a descarga direta no meio ambiente ou no sistema de esgotos e a utilização como matéria-prima para a alimentação animal, foram durante muito tempo as principais aplicações encontradas pela indústria, para este subproduto (Smithers, 2008; Parashar *et al.*, 2015). Contudo, com o avanço da ciência e com a criação de leis ambientais mais exigentes, o soro passou a ser encarado como um subproduto de elevado valor acrescentado, ao invés de um resíduo sem utilidade (ver Tabela 5). O soro de queijo é, no entanto, uma matéria-prima altamente perecível, não podendo ser armazenada por longos períodos, sendo necessárias medidas que visem o seu aproveitamento e/ou tratamento de modo que quando descartado, não cause impacto negativo ao meio ambiente. Assim, diz respeito aos produtores de soro decidir qual o seu destino final.

As tecnologias de processamento cresceram exponencialmente nos últimos anos devido ao desenvolvimento dos processos membranares e dos métodos de permuta iónica, bem como um melhor entendimento do soro como matéria-prima (Akpinar-Bayizit *et al.*, 2009). O facto de o soro ser um excelente reservatório de hidratos de carbonos, como a lactose e a presença de outros nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, faz do soro uma matéria-prima potencial para a produção de uma variedade de bio-produtos (Panesar *et al.*, 2007). Além disso, as propriedades funcionais dos produtos à base de soro são de grande importância para os produtores de alimentos lácteos fermentados probióticos ou nutracêuticos. Assim, os alimentos à base de soro, não permitem apenas ao fabricante reduzir o valor total dos ingredientes como também oferece a importante vantagem de possuírem propriedades funcionais excecionais (Thamer e Penna, 2006).

**Tabela 5 –** Principais caraterísticas da utilização do soro de queijo (adaptado de Alais, 1984).

| Vantagens | Desvantagens |
|---|---|
| Fracionamento de proteínas: com alto valor nutritivo (lys, thr, leu, ser) | Alta diluição – necessário desidratar - altos custos de energia |
| Recuperação dos principais componentes do leite | Alto teor de sal (cerca de 10% da matéria seca) |
| Produção de lactose | Alto teor de proteína/açúcar – necessário deslactosar |
| Redução da poluição | Matéria-prima putrescível (proteção, celeridade) |
| | Instalações de produção de queijo altamente dispersas |
| | Necessidade de inovação das técnicas (ultrafiltração, diafiltração) |

### 1.3.1. Possíveis aplicações do soro

O soro tem sido desde a antiguidade, valorizado pelo Homem, sendo utilizado como ração animal ou como fertilizante. Em Portugal, cerca de 50 % do soro seco é utilizado como alimento para animais. No entanto, por razões económicas é difícil utilizá-lo com esta finalidade, uma vez que os processos de secagem são dispendiosos (Fazão, 2001).

Nas últimas décadas, as técnicas existentes para o aproveitamento do soro permitem obter diversos produtos finais, tais como produtos de fermentação, requeijão e outros queijos, soro em pó, concentrados proteicos e lactose, ou ainda utilizá-lo como substrato para a produção de extrato de leveduras, sendo este utilizado para realçar o sabor de alimentos em substituição ao monoglutamato de sódio (Révillion *et al.*, 2000). Os queijos tipo *Ricotta*, conhecidos em todo o mundo e do qual faz parte o Requeijão português, são produzidos com base no princípio da coagulação das proteínas do soro, através do aquecimento a uma temperatura igual ou superior a 90 °C, durante poucos minutos, e os queijos tipo *Mysost*, são produzidos através da evaporação da água do soro (Jelen, 2011).

A valorização biotecnológica do soro, como substrato fermentativo, tem vindo a ser explorada, nomeadamente para a produção de bioetanol, biogás e ácido lático, uma vez que este possui elevados teores de lactose e proteínas (Smithers, 2008; Comino *et al.*, 2012; Ariyanti *et al.*, 2014). Além disso, algumas empresas utilizam o soro como meio de propagação de bactérias láticas, utilizadas no processo de produção do queijo (Jelen, 2011).

Os avanços nas tecnologias de membranas, como a microfiltração ou a ultrafiltração, permitiram o desenvolvimento de ingredientes ricos em proteínas e com um teor de gordura reduzido, tais como os CPS, que contêm < 90% de proteína, ou os isolados proteicos de soro (IPS), com um teor > 90% de proteína (Smithers, 2008; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Dependendo do pré-tratamento efetuado ao soro, os produtos obtidos diferem na sua composição em termos de lactose e proteínas (Tabela 6).

Atualmente têm sido realizados estudos para o desenvolvimento de um novo conjunto de produtos: as bebidas à base de soro. Para as indústrias de lacticínios, a conversão do soro líquido em bebidas, por fermentação ou não, é uma das mais atrativas opções, para a utilização do soro para consumo humano, devido à simplicidade do processo, utilização de equipamentos que beneficiam as propriedades do leite, além das excelentes propriedades funcionais da proteína do soro. As bebidas lácteas à base de soro são de grande valor dietético, de fácil digestão, leves e agradáveis de serem consumidas (Almeida *et al.* 2001; Magalhães *et al.,* 2010; Pescuma *et al.*, 2010, Chavan *et al.*, 2015).

**Tabela 6 –** Composição dos principais tipos de soro em pó (% m/m) (Adaptado de Jelen, 2011).

| Produto | Proteína total | Lactose | Minerais |
|---|---|---|---|
| **Soro em pó** | 12,5 | 73,5 | 8,5 |
| **DWP (90%)** | 15 | 83 | 1 |
| **Permeado de soro** | 1 | 90 | 9 |
| **WPC** | 65-80 | 4-21 | 3-5 |
| **WPI** | 88-92 | <1 | 2-3 |

DWP – Soro desmineralizado, WPC – Concentrado proteico de soro, WPI – Isolado proteico de soro.

De facto, o soro é agora considerado um co-produto, em vez de um subproduto da produção de queijo, devido à grande quantidade de aplicações possíveis (Walzem *et al.*, 2002; Balagtas *et al.*, 2003).

## 1.4. Proteínas do soro como fonte de ingredientes funcionais

Ao longo dos anos, tem-se verificado um crescente interesse na produção em grande escala de péptidos bioativos. Estes péptidos podem ser utilizados na produção de novos alimentos funcionais, como agentes de intervenção contra doenças crónicas e na manutenção do bem-estar do ser humano (Udenigwe e Aluko, 2012; Özen *et al.*, 2014).

Os primeiros péptidos bioativos a serem descobertos foram os caseinofosfopéptidos (CPPs) por Mellander em 1950, quando sugeriu que péptidos fosforilados derivados da caseína potenciavam a vitamina D na calcificação dos ossos em crianças raquíticas (Korhonen e Pihlanto 2003). Em 1979 foi descoberta uma atividade similar à que está presente na morfina, num hidrolisado de proteínas lácteas. Desde então, têm sido descritos numerosos péptidos com distintas atividades biológicas derivados de proteínas alimentares. Estes péptidos podem variar entre 3 e 20 aminoácidos e podem ser derivados de proteínas animais ou vegetais e alguns deles são multifuncionais, podendo exercer mais do que uma

propriedade funcional (Rai *et al.*, 2015).

Como já foi referido anteriormente, os péptidos bioativos são sequências de aminoácidos que embora estejam inativos nas proteínas de origem, são ativados durante o processo digestivo ou durante o processamento alimentar. Uma vez libertados, alguns péptidos são absorvidos no trato intestinal, e a maioria deles atua diretamente no trato intestinal ou através de recetores ou de sinalização de células no intestino, exercendo diversas funções fisiológicas (Korhonen e Pihlanto 2003; Choi *et al.*, 2012; Udenigwe e Aluko, 2012). Neste contexto, têm sido definidos como fragmentos de proteínas específicas, que apresentam um impacto positivo sobre as funções do organismo, influenciando de forma benéfica a saúde (Kitts e Weiler, 2003). Na maioria dos casos, estes péptidos têm demonstrado possuir uma bioatividade mais elevada do que as proteínas originais, e a sua administração pode afetar de uma forma positiva o sistema cardiovascular, digestivo, imunitário ou nervoso (Korhonen e Pihlanto, 2006; Hartmann e Meisel, 2007; Udenigwe e Aluko, 2012). As principais atividades biológicas das proteínas/péptidos de soro de leite estão listadas na Tabela 7.

**Tabela 7 –** Funções biológicas das proteínas / péptidos do soro (adaptado de Madureira *et al.*, 2007).

| Proteína/Péptido | Tratamento | Função biológica | Referência |
|---|---|---|---|
| ***Proteína do soro total*** | | Prevenção do cancro | Gill *et al.* (2000) |
| | | Cancro da mama e intestinal | Badger *et al.* (2001) |
| | | Cancro induzido quimicamente | Hakkak *et al.* (2000); Rowlands *et al.* (2001) |
| | | Aumento dos níveis de glutationa | Parodi (1998) |
| | | Aumento da vulnerabilidade das células tumorais | Micke *et al.*(2001); Micke *et al.*(2002) |
| | | Atividade antimicrobiana | Clare *et al.* (2003) |
| | | Aumento da resposta de saciedade | |
| | | Aumento de aminoácidos no plasma, a colecistoquinina e o péptido tipo glucagon | Hall *et al.* (2003) |
| | Hidrólise enzimática | **Inibidor ECA** | Tavares *et al.* (2011a) |
| | | Anti – ulcerativa | |
| | | Produção de prostaglandina | Mezzaroba *et al.* (2006) |
| | Hidrólise enzimática | Anti – ulcerativa | Tavares *et al.* (2011b) |
| ***β-Lactoglobulina*** | | Transportador | |
| | | Retinol | Madureira *et al.* (2007) |
| | | Palmitato | Wu *et al.* (1999) |
| | | Ácidos gordos | Tsutsumi e Tsutsumi (2014) |
| | | Aumento dos níveis de glutationa | |
| | | Defesa celular contra stress oxidativo e desintoxicação | Bounous (2000) |
| | | Aumento da atividade da esterase pré-gástrica | Tsutsumi e Tsutsumi (2014) |
| | | Transferência de imunidade passiva | Warme *et al.* (1974) |
| | | Regulação do metabolismo do fósforo na glândula mamária | Farrel *et al.* (1987) |
| | Hidrólise enzimática Fermentação | **Inibidor ECA** | Roufik *et al.* (2007) |
| | Hidrólise enzimática | Antimicrobiana contra várias bactérias gram-positivas | Expósito e Récio (2006) |
| | Hidrólise enzimática | Antimicrobiana (bactericida) | Groleau *et al.* (2003) |
| | Hidrólise enzimática | Hipocolesterolémico | Groleau *et al.* (2003) |
| | Hidrólise enzimática | Agonista apióide | Hartmann e Meisel (2007) |
| | Hidrólise enzimática | **Anti – hipertensiva** | Tavares *et al.* (2011c) |
| | Hidrólise enzimática | Contração do íleo | Meisel e Schlimme (1996) |
| | Hidrólise enzimática | Antinociceptivo | Yamauchi *et al.* (2003) |
| | | Prevenção do cancro | |
| | Hidrólise enzimática | Cancro intestinal | McIntosh *et al.* (1998 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ***α-Lactalbumina*** | | Prevenção do cancro | de Wit (1998) |
| | | Apoptose de células tumorais | Svensson *et al.* (2002); Tsutsumi e Tsutsumi (2014) |
| | | Síntese de lactose | Markus *et al.* (2002); Tsutsumi e Tsutsumi (2014) |
| | | Tratamento de doença crónica induzida pelo stress | Ganjam *et al.* (1997) |
| | | Antimicrobiana (bactericida) | |
| | | Streptococcus pneumonia | Hakansson *et al.* (2000) |
| | | Redução do stress | Markus *et al.* (2002) |
| | | Imuno - modulação | Montagne *et al.* (2000) |
| | Hidrólise enzimática | Antimicrobiana com várias bactérias gram-positivas | Expósito e Récio (2006) |
| | Hidrólise enzimática | Agonista opióide | Meisel e FitzGerald (2000) |
| | Hidrólise enzimática | **Inibidor ECA** | Chatterton *et al.* (2006) |
| | Hidrólise enzimática | **Anti – hipertensiva** | Tavares *et al.* (2011c) |
| | Hidrólise enzimática | Contração do íleo | Meisel e Schlimme (1996) |
| | | Anti – ulcerativa | |
| | | Produção prostaglandinas | Rosaneli *et al.* (2004) |
| ***Albumina sérica bovina*** | | Ligação ácido gordo | Walzem *et al.* (2002) |
| | | Antioxidante | Tong *et al.* (2000) |
| | | Prevenção do cancro | Laursen *et al.* (1990) |
| | Hidrólise enzimática | **Inibidor ECA** | FitzGerald *et al.* (2004) |
| | Hidrólise enzimática | Contração do íleo | Yamauchi (1992) |
| | Hidrólise enzimática | Agonista opióide | Meisel e FitzGerald (2000) |
| ***Imunoglobulinas*** | | Imuno – modulação | Ormrod e Miller (1991) |
| | | Proteção de doença através da imunidade passive | Mitra *et al.* (1995) |
| | | Antibacteriana | Loimaranta *et al.* (1999) |
| | | Antifúngica | Okhuysen *et al.* (1998) |
| | | Agonista opióide | Sharpe *et al.* (1994) |
| ***Caseinomacropéptido*** | | Antitrombótica | Manso *et al.* (2002) |
| | | **Inibidor ECA** | Mizuno *et al.* (2005) |
| | | Antimicrobiana | Bruck *et al.* (2003) |
| | Hidrólise enzimática | Prebiótico | Bouhallab *et al.* (1993) |
| | | Aumento da resposta de saciedade | |
| | | Aumento de aminoácidos plasmáticos e péptido colecistoquinina | Dartey *et al.* (2003) |

## 1.5. Hidrólise enzimática

Uma vez que a maioria das proteínas nativas não apresentam propriedades funcionais, existe a necessidade de melhorar as suas funções, através da libertação dos seus péptidos bioativos. Os péptidos bioativos provenientes do soro podem ser obtidos através do processo digestivo, ou no processamento alimentar, quer através de processos de fermentação, com enzimas derivadas de microrganismos ou através da hidrólise com enzimas de origem animal ou vegetal. Em alguns casos, verificou-se que uma combinação destes processos é crucial para se obter péptidos funcionais de tamanho pequeno (Korhonen e Pihlanto 2003, 2006; Yamamoto *et al.*, 2003; Möller *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 2013).

A hidrólise enzimática é largamente usada pelas indústrias alimentares, devido à disponibilidade de uma vasta gama de enzimas que são consideradas seguras e naturais. Atualmente, várias enzimas são usadas na indústria, as mais utilizadas são as enzimas de origem animal – tripsina, pepsina e quimotripsina; também existem alguns estudos de utilização de enzimas derivadas de plantas, principalmente papaína e bromelina e de proteases bacterianas, sobretudo as provenientes de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, ou uma mistura destas enzimas (Jeewanthi *et al.*, 2015).

A hidrólise pode ocorrer por dois mecanismos: o mecanismo de um por um, no qual é necessário desdobrar parcialmente as proteínas nativas, causando-lhes a perda da estabilidade e expondo as ligações peptídicas, permitindo que a enzima tenha acesso à ligação peptídica; e um mecanismo de "fecho de correr", em que a proteína nativa é rapidamente convertida em produtos intermediários e ocorre a hidrólise da proteína indireta e lentamente (Eckert *et al.*, 2013). Existem dois tipos de hidrólise enzimática: hidrólise convencional ou hidrólise continua, sendo que esta última utiliza membranas de ultrafiltração, para as quais existem vantagens e desvantagens, que são apresentadas na Tabela 8 (Korhonen e Pihlanto., 2003; Choi *et al.*, 2012).

**Tabela 8 –** Vantagens e desvantagens dos dois tipos de hidrólise enzimática (Korhonen e Pihlanto, 2003, 2006).

| **Hidrólise Convencional** | | **Hidrólise Continua** | |
|---|---|---|---|
| Vantagens | Desvantagens | Vantagens | Desvantagens |
| A separação do produto e recuperação da catálise é feita em uma única operação | Enzimas caras<br>Menos eficiência | Maior eficiência devido a reatores de ultrafiltração de membrana<br>Aumento da produtividade | Processo caro |

A hidrólise enzimática pode modificar e melhorar as propriedades funcionais das proteínas, diminuindo a viscosidade, aumentando a solubilidade e a capacidade espumante sem afetar o seu valor nutritivo, ao mesmo tempo que as converte em péptidos de tamanho desejado (Jamdar *et al.*, 2010; Chen e Chi, 2012). No entanto, certos parâmetros de hidrólise, como o tempo e temperatura de incubação, a razão enzima substrato, a especificidade, o pH e a força iónica da enzima, assim como a presença de ativadores e inibidores, o grau de hidrólise (GH) da proteína, e o pré-tratamento das proteínas antes da hidrólise são muito importantes, uma vez que eles podem potenciar a hidrólise enzimática e aumentar as interações entre a enzima e o substrato (Udenigwe e Aluko, 2012; Eckert *et al.*, 2013). A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise química, tais como: o controlo do grau de hidrólise, especificidade, condições moderadas de ação, enzimas com custo moderado e disponibilidade comercial em larga escala, além do controlo das condições hidrolíticas (pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração do substrato) (Biasutti *et al.*, 2008). De acordo com Pattarin *et al.* (2010), para obter péptidos bioativos do soro, a hidrólise enzimática é geralmente considerada o método mais indicado, pois pode minimizar o impacto do pH e uso de temperatura extremas que podem levar à desnaturação proteica e perda de suas funções biológicas.

As propriedades dos péptidos bioativos dependem do GH das suas proteínas. Portanto, é necessário determinar o GH que corresponde à percentagem do número total de ligações peptídicas que são clivados durante a hidrólise (Spellman *et al.*, 2003; Jamdar *et al.*, 2010; Chen e Chi, 2012). O GH pode ser determinado através de diferentes métodos, pH-stat ou através da determinação da quantidade de grupos azoto ou amino livres libertados durante a hidrólise. A determinação dos grupos amino livres pode ser realizada por titulação com formol ou por compostos que reagem especificamente com grupos amino, tais como o ácido 2,4,6-trinitrobenzoico (TNBS), *o*-oftaldialdeído (OPA), teste da ninidrina ou fluoresceína. Porém, os mais frequentemente utilizados são o método OPA e TNBS. O primeiro baseia-se na reação específica entre os grupos amino primários e OPA para formar isoindoles que podem ser quantificados por espectrofotometria a 340 nm ou a 455 nm fluorometricamente. Uma desvantagem deste método é a baixa reatividade para os resíduos de cisteína e prolina. O método de TNBS também reage especificamente com grupos amino primários para formar um cromóforo com uma absorvância máxima a 420 nm (Figura 1). Esta reação ocorre em condições alcalinas e é parada através da adição de um reagente de redução do pH. Contudo, o TNBS não é totalmente seletivo para grupos amino primários e também reage lentamente com iões hidróxilo presentes e este aumento é estimulado pela luz, pelo que é necessário ter algum cuidado com este método (Nielsen *et al.*, 2001; Spellman *et al.*, 2003; Jamdar *et al.*, 2010).

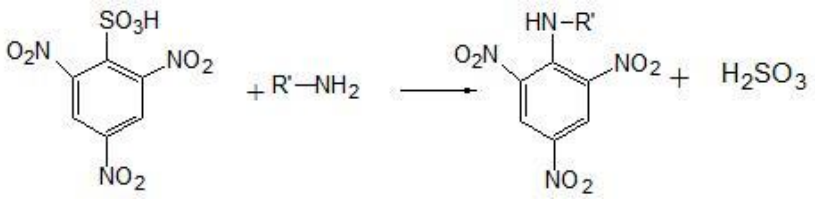



**Figura 1 –** Reação do TNBS com grupos amino (Rutherford, 2010).

### 1.5.1. Enzimas coagulantes

#### 1.5.1.1. Enzimas coagulantes de origem animal/vegetal

As enzimas utilizadas na coagulação do leite são normalmente preparações de proteínas selecionadas que, de uma forma geral, possuem uma atividade coagulante elevada e uma atividade proteolítica (não específica) relativamente baixa (Férnandez-Salguero *et al.*, 2003; Bornaz *et al.*, 2010). O coalho animal proveniente do estômago do vitelo, composto por 88-94% de quimosina e 6-12% de pepsina, tem sido desde há longos anos o agente coagulante de eleição no fabrico do queijo (Tavaria *et al.*, 2001; Moschopoulous, 2011). A quimosina é uma protease aspártica, considerada como o melhor agente coagulante devido à sua elevada especificidade para a clivagem da ligação peptídica da κ-caseína entre os aminoácidos F105-M106 (Expósito *et al.*, 2016). Quanto mais novo for o animal, mais elevado é o teor de quimosina presente no coalho, sendo o seu teor também influenciado pela dieta (Férnandez-Salguero *et al.*, 2003). A pepsina de porco é também um coagulante de origem animal com bastante sucesso comercial no fabrico de queijo. No entanto, devido ao crescente aumento da produção de queijo a nível mundial, a oferta de coalho animal tornou-se inferior à procura, fator que levou ao aumento do preço e à pesquisa de agentes coagulantes alternativos, nomeadamente de origem microbiana e vegetal. Quanto a coalhos de origem microbiana, as proteases de *Mucor miehei, Mucor pusillus e Endothia parasitica* são as mais utilizadas (Ustonol e Zecker, 1996). Apesar deste facto, em Portugal sempre existiu uma grande tradição, principalmente a nível artesanal, em pequenas explorações leiteiras e quintas agrícolas, no uso do coalho vegetal no fabrico de queijo tradicional português (Silva e Malcata, 2005, Roseiro *et al.*, 2003). São várias as fontes de coagulantes de origem vegetal do leite, sendo o cardo (*Cynara cardunculus*) o que mais tem sido utilizado ao longo dos vários séculos de produção tradicional de queijo na Península Ibérica (Macedo *et al.*, 1993a; Roseiro *et al.*, 2003). Nos coalhos estão presentes enzimas, que atuam sobre a alfa e beta caseínas do leite desdobrando-as em péptidos de cadeia mais curta (Fox *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2001). Contudo, a utilização de coalhos de origem vegetal é por vezes indesejável, dado que muitas preparações enzimáticas mostraram-se excessivamente proteolíticas no fabrico de queijo, causando defeitos a nível de sabor e

textura. Tais dificuldades advêm da presença de enzimas não específicas e/ou pertencentes a sistemas enzimáticos complexos e, como tal, difíceis de controlar. As proteinases, presentes nos extratos aquosos de plantas do género *Cynara* são uma exceção geral à fraca adequação dos coagulantes de origem vegetal para a produção de queijos. Sabe-se que, apesar da sua elevada atividade proteolítica, *Cynara cardunculus* pode ser um substituto dos coalhos de origem animal, para o fabrico de queijos amanteigados. Com efeito, das flores de *Cynara cardunculus*, é possível isolar as cardosinas (proteases aspárticas) que apresentam o mesmo comportamento do que outras enzimas coagulantes do leite, na clivagem da k-caseína (Sousa et al., 2001).

#### 1.5.1.2.*Cynara cardunculus*

Espécies vegetais do género *Cynara*, da família das *Asteracea*, nomeadamente *Cynara cardunculus* L. e *Cynara humilis* L., vulgarmente conhecidas por cardo, têm vindo a ser utilizadas com sucesso, para o fabrico de queijos tradicionais a partir de leite de ovelha e/ou cabra, como é o caso dos queijos: Serra da Estrela, Serpa e Azeitão em Portugal e Serena, Torta del Casar, Flor de Guia e Los Pedroches em Espanha (Silva *et al.*, 2003). Em Portugal, é usado com maior frequência o cardo da espécie *Cynara cardunculus*. Trata-se de uma planta de grande porte, que cresce de forma selvagem em regiões áridas, rochosas e bravias na zona sul do país, principalmente Estremadura, Alentejo e Algarve (Roseiro *et al.*, 2003), começando hoje em dia a ser cultivada cada vez mais propositadamente. As flores de cardo são apanhadas e secas ao ar, ao abrigo de humidade e da luz direta do sol (mas sem qualquer outro tratamento especial), sendo de seguida guardadas em panos ou sacos de plástico, e posteriormente vendidas em mercados locais. Uma vez que não se utilizam condições padronizadas para o corte e secagem das flores, a atividade dos extratos de cardo é extremamente variável, dependendo da variedade, do estado de maturação, do tempo de secagem e da parte da flor utilizada.

Embora o cardo vendido deva supostamente conter apenas flores de *C. cardunculus*, análises efetuadas revelam que muitas vezes estas se encontram misturadas com flores de *C. humilis*. Esta planta, de porte mais pequeno do que *C. cardunculus*, cresce de forma espontânea e abundantemente na zona centro do País e no Alentejo. Os extratos obtidos a partir das flores da planta selvagem *C. cardunculus* têm sido largamente usados na coagulação do leite tendo-se tornado um excelente substituto do coalho animal na produção de queijos de ovelha e cabra principalmente. Tal é conseguido pela ação de duas proteases aspárticas denominadas cardosinas A e B (Silva *et al.*, 2003). As condições ótimas para estas enzimas situam-se na faixa de pH 5,2 a 6,0 a 55 ºC (Barros e Malcata, 2004). Estas são capazes de quebrar ligações específicas em péptidos e este é o primeiro passo para

a coagulação do leite. De acordo com Veríssimo (1995), a cardosina B tem uma maior especificidade do que a A embora apresentem a mesma preferência relativamente à quebra das ligações peptídicas com cadeias laterais hidrofóbicas. A grande maioria dos macropéptidos são perdidos para o soro. Estudos prévios mostraram que a extensão da hidrólise de proteínas do soro por ação de cardosinas é quase nula para a β-Lg, contrariamente à α-La – a qual é totalmente hidrolisada, sendo facilmente convertida em péptidos de baixo peso molecular (Barros e Malcata, 2004; Tavares *et al.*,2011).

Por trabalhos anteriormente publicados (Tavares *et al.,* 2011abc, 2012a,b, 2013) sabe-se que para além de outras atividades, os concentrados peptídicos obtidos a partir da hidrólise de proteínas do soro com extrato de *Cynara cardunculus* apresenta uma excecional atividade inibidora da ECA e concomitante atividade anti-hipertensiva *in vivo*. Sendo assim torna-se pertinente perceber a forma como as principais enzimas do extrato vegetal contribuem para essa atividade, para melhor se conseguir caracterizar o extrato peptídico.

## 1.6. Atividade anti-hipertensiva

A hipertensão é uma doença muito comum nos países desenvolvidos, afetando quase um quarto da população mundial, estando associada a outras doenças relevantes, tais como a obesidade, pré-diabetes, arteriosclerose, doença coronária, insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular cerebral (Chalmers *et al.*, 2000; Chobanian *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2008; Lignitto *et al.*, 2010). Deste modo, o seu tratamento reduz o risco de incidência de doenças cardíacas, que atualmente representam 30% das mortes em todo o Mundo (Murray e Lopez, 1996).

Atualmente, a pressão arterial pode ser regulada introduzindo alterações na dieta e praticando exercício físico, bem como pela administração de medicamentos sintéticos: β-bloqueadores, diuréticos, antagonistas dos canais T de cálcio, inibidores da ECA e bloqueadores de recetores da angiotensina II (FitzGerald e Murray, 2006; Torruco-Uco *et al.*, 2009). Contudo, a pressão sanguínea do corpo humano é regulada por várias vias bioquímicas. Tradicionalmente, o seu controlo está associado ao sistema renina-angiotensina, no entanto também se produzem substâncias vaso reguladoras por outras vias, tais como o sistema cinina-calicreína, o sistema da endopeptidase neutral e o sistema da enzima conversora de endotelina (Figura 2). Através destes sistemas produzem-se uma série de péptidos, que conjuntamente com o balanço de fluidos e eletrólitos do organismo, regulam a pressão arterial (FitzGerald *et al.*, 2004). Uma vez que a dieta tem uma relação direta com a hipertensão, a indústria alimentar, em associação com instituições académicas

e de saúde pública, tem-se centrado no desenvolvimento de novos ingredientes funcionais que auxiliam na manutenção de uma pressão arterial normal – evitando assim a necessidade de tomar medicamentos anti-hipertensivos (Hartman e Meisel, 2007; Hernandez-Ledesma *et al.,* 2011; Sánchez *et al.*, 2011). Há de facto evidências científicas de que certos péptidos são capazes de reduzir a pressão arterial (López-Fandiño *et al.*, 2006; Quirós *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2009;). Os mecanismos subjacentes estão aparentemente relacionados com a interação dos péptidos com os recetores de opióides, e a libertação concomitante de óxido nítrico que causa vasodilatação afetando assim a pressão sanguínea. Os péptidos apresentam, relativamente a outros opiáceos a vantagem de não causarem efeitos secundários tal como a morfina (Ijäs *et al.*, 2004). Eles são geralmente obtidos a partir de proteínas precursoras em alimentos, por hidrólise enzimática utilizando microrganismos viáveis, ou hidrolisadas por proteases específicas (FitzGerald *et al.*, 2004; Hartmann e Meisel, 2007; Korhonen, 2009). Outro mecanismo através do qual os péptidos podem diminuir a tensão deve-se à capacidade que certas sequências de aminoácidos têm para quelatar minerais (Scholz-Ahrens e Schrezenmeir, 2000).

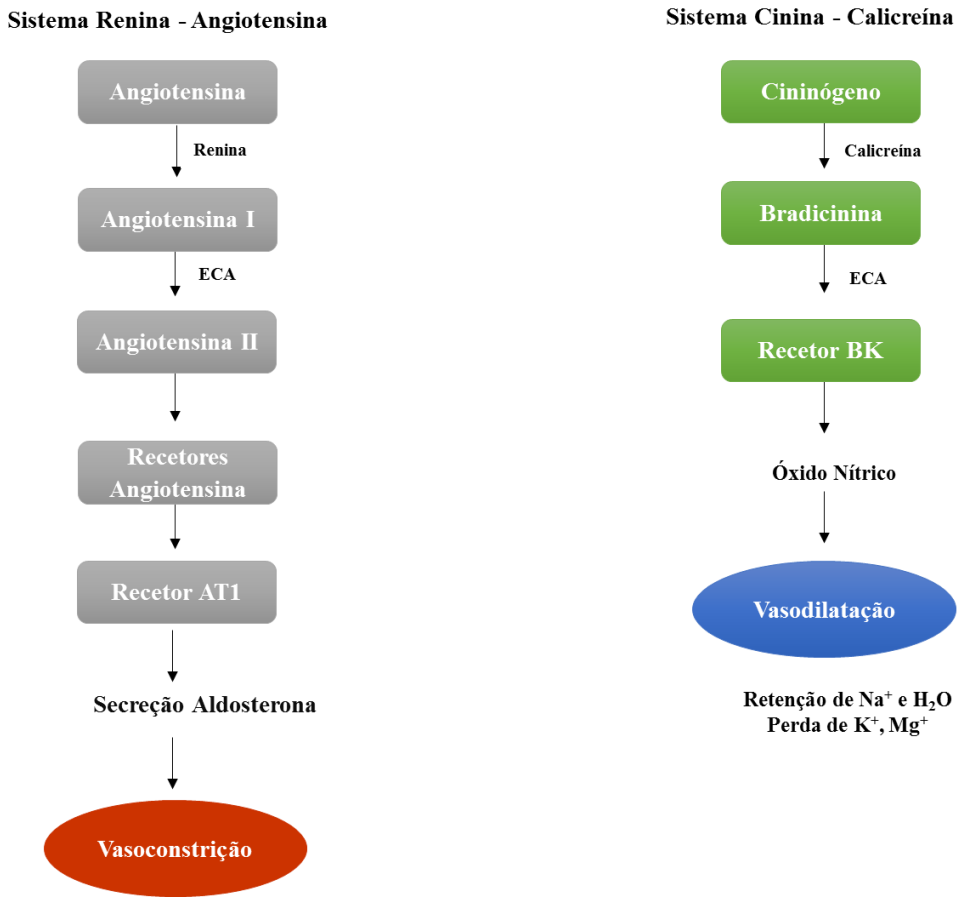



**Figura 2 –** Reações catalisadas pela enzima conversora da angiotensina (ECA) e os seus efeitos fisiológicos (adaptado de Zaman *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2013).

A diminuição da pressão arterial mediante a inibição da ECA é um dos mecanismos mais estudados. A ECA é uma dipeptidil-carboxipeptidase responsável pela vasoconstrição, possuindo um papel importante na regulação da pressão arterial, uma vez que converte a angiotensina I, um decapéptido inativo sintetizado pelos rins, na angiotensina II, um octapéptido com ação hipertensiva. A angiotensina II ativa o recetor de angiotensina II do tipo 1 (AT1), – um membro da superfamília do recetor acoplado a proteína G - que tem vários efeitos, tais como vasoconstrição e estimulação da síntese e libertação de aldosterona (o que leva à retenção de sódio), e consequentemente eleva a pressão arterial. Além disso, a ECA atua no sistema cinina-calicreína, que catalisa a degradação do nanopéptido bradicinina que é um poente vasodilatador. Os inibidores da ECA por sua vez estão envolvidos na regulação do sistema renina – angiotensina impedindo a formação da angiotensina II e diminuem o metabolismo da bradicinina, envolvido na dilatação sistémica das artérias e veias que conduzem à diminuição da pressão arterial do sangue. A inibição da formação de angiotensina II diminui a secreção de aldosterona a partir do córtex renal, diminuindo a reabsorção de sódio e água, com a concomitante redução de volume extracelular, o que reduz a pressão sanguínea (Nagaoka *et al.*, 2001; Tavares *et al.*, 2011; Chen e Chi, 2012; Huang *et al.*, 2013). Assim, a inibição da ECA resulta num efeito anti-hipertensivo e pode também influenciar diferentes sistemas regulatórios envolvidos na modulação da pressão arterial, defesa imune e atividade do sistema nervoso (Pripp *et al.*, 2006; Lignitto *et al.*, 2010).

Alguns inibidores da ECA como os fármacos Captopril, Enalapril e Lisinopril, são usados como tratamento médico para diminuir a tensão arterial. No entanto, causam efeitos adversos, incluindo tosse seca, reações alérgicas, perturbações do paladar e erupções cutâneas (Lee *et al.*, 2006). Portanto, um dos principais interesses de estudo tem sido o desenvolvimento de inibidores da ECA mais seguros.

Nos últimos anos, vários estudos indicaram a capacidade de certos péptidos, formados como consequência da proteólise proteica, inibirem a ação da enzima conversora de angiotensina I em angiotensina II (Korhonen e Pihlanto, 2006; Dabarera *et al.*, 2015). Estes péptidos são, portanto, potenciais agentes para o tratamento da hipertensão, e podem ser utilizados como ingredientes para o desenvolvimento de novos fármacos e alimentos funcionais (Silva e Malcata, 2005).

### 1.6.1. Péptidos do soro com atividade anti-hipertensiva

Embora diferentes proteínas alimentares possam agir como percursoras de péptidos inibidores da ECA, as proteínas lácteas constituem a fonte mais importante. Esses péptidos geralmente contêm 2-20 resíduos de aminoácidos, apesar de serem encontrados péptidos ativos até 27 aminoácidos. Péptidos inibidores da ECA derivados da caseína são chamados de casoquininas e, os derivados das proteínas do soro, de lactoquininas (Saito *et al.*, 2000; FitzGerald *et al.*, 2004).

Como já foi mencionado na secção 1.1.1 as caseínas são as proteínas mais abundantes no leite. O facto de possuírem uma estrutura aberta e flexível torna-as suscetíveis à proteólise, logo, inibidores da ECA têm sido frequentemente obtidos através da hidrólise enzimática da caseína. As caseínas individuais, f (25-27), de αs1- caseína são um potente inibidor da ECA *in vitro* com um $IC_{50}$ de 2,0 μmol/L, já a albumina de soro bovino, por exemplo, tem um $IC_{50}$ de 3,0 μmol/L. (FitzGerald *et al.*, 2004). Os estudos com péptidos de proteínas do soro com atividade inibidora da ECA são mais limitados, devido à estrutura rígida da β-Lg (a principal proteína de soro de leite), fazendo com que esta seja resistente às enzimas digestivas (Otte *et al.*, 2007). Contudo, fragmentos de proteínas bioativas têm sido encontrados em hidrolisados de proteínas de soro (Pihlanto-Leppälä, 2001; Hernández-Ledesma *et al.*, 2002; Otte *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2011). Péptidos de β- lg obtidos a partir de digestão tríptica, tais como Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) foram identificados por possuírem forte atividade anti-hipertensiva (Tabela 9) (Maes *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007). Manso e Lopez-Fandiño (2003) também identificaram sequências com atividade inibidora da ECA em hidrolisados de CMP. Num estudo, usando ratos espontaneamente hipertensos (SHR), foram identificados dois tripéptidos, Gly-Thr-Trp e Gly-Val-Thr (GTW e GVT) com forte atividade inibidora da ECA, tendo sido demonstrado um efeito anti-hipertensivo num hidrolisado contendo estes péptidos (Korhonen, 2009).

Como ilustrado na Tabela 9, os péptidos inibidores da ECA são produzidos principalmente por hidrólise enzimática, contudo algumas sequências ativas também são obtidas através de síntese química (Kohmura *et al.*, 1989). Trabalhos realizados por Tavares *et al.* (2011) mostraram a produção de concentrados peptídicos com uma potente atividade inibidora da ECA, através da hidrólise de CPS com o extrato aquoso de C. *Cardunculus*, apresentando valores de $IC_{50}$ de 52,9 ± 2,9 μg/mL para a fração total, e de 23,6 ± 1,1 μg/mL para a fração com peso molecular inferior a 3 KDa. Tendo-se demostrado também um efeito anti-hipertensivo *in vivo* após administração oral a ratos SHR para ambos os concentrados peptídicos e dois péptidos correspondendo à f (16-26) com a sequência Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp (KGYGGVSLPEW) e α-La f (97-104) com Asp-Lys-Val-Gly-

Ile-Asn-Tyr-Trp (DKVGINYW). KGYGGVSLPEW demonstrou exercer uma atividade anti-hipertensiva particularmente significativa, embora não tivesse permanecido intacto durante a digestão gastrointestinal. O efeito anti-hipertensivo associado aos péptidos DKVGINYW e KGYGGVSLPEW é comparável ao exibido pelo Val-Pro-Pro (VPP) – um péptido anti-hipertensivo já incluído em alimentos funcionais disponíveis no mercado (Tavares, 2011).

A atividade inibidora da ECA poderá ser explicada pelo tipo de péptidos formados durante a hidrólise, uma vez que alguns estudos demonstram que a inibição desta enzima é geralmente maior quando os péptidos contêm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos em cada uma das suas três posições C-terminal, sendo que o Tyr, Phe, Trp e/ou Pro são os aminoácidos mais presentes nesta posição de péptidos inibidores de ECA (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Corrêa *et al.*, 2014). A extremidade -C catalítica da ECA consiste em três sublocais (S1, S1 'e S2'), que acomodam os três resíduos hidrofóbicos no terminal C do substrato natural (angiotensina I). Nesta perspetiva, as enzimas com especificidade para o lado carboxílico dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos tendem a gerar péptidos inibidores de ECA altamente ativos (Corrêa *et al.*, 2014).

Para medir a atividade de inibição da ECA *in vitro*, existem métodos espetrofotométricos, cromatográficos e radioquímicos. As mais amplamente utilizadas são as que utilizam procedimentos espectrofotométricos com hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) ou furanacryloyl-L-fenil-alanylglycylglycine (FAPGG) como substrato. Neste trabalho, a inibição da ECA foi quantificada por um procedimento fluorimétrico, desenvolvido por Sentandreu e Toldrá (2006). Foi utilizado o tripéptido fluorescente *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitrophenylalanylproline (Abz-Gly-Phe(NO2)-Pro) como substrato. Este método apresenta a vantagem de ser rápido, simples e sensível, permitindo a monitorização contínua da atividade da ECA. Além disso, envolve apenas a utilização de um reagente, podendo ser analisadas um grande número de amostras num curto espaço de tempo. Este método permite o cálculo do valor de $IC_{50}$, isto é, a concentração de inibidor necessária para inibir a atividade de ECA em 50% (Vermeirssen *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2004; Quirós *et al.*, 2009). Os valores de $IC5_o$ baixos significam que uma pequena concentração de substância inibidora é necessária para produzir a inibição da enzima, de modo que a substância em causa apresenta uma potente atividade inibidora.

**Tabela 9 –** Características estruturais primárias de péptidos de soro com atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (ECA), e vetores de geração destes (Tavares, 2011).

| Fonte proteica | Enzima | Fragmento peptídico | Sequência de aminoácidos | Atividade IECA IC50[a] (μM) | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Proteína do soro total*** | Fermentação + tripsina e quimotripsina + tripsina | β-Lg f9-14 | GLDIQK | 580 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000); FitzGerald e Murray (2006) |
| | Iogurte + tripsina + pepsina | β-Lg f15-20 | VAGTWY | 1682 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (1998) |
| | Fermentação com bactérias do ácido láctico + Prozyme 6 | β-Lg f17-19 | GTW | 464.4 | Chen *et al.* (2007) |
| | Proteinase K | β-Lg f78-80 | IPA | 141 | Abubakar *et al.* (1998) |
| | Neutrase | α-La f105-110 | NYWL | 11 | Scholthauer *et al.* (2002) |
| | Fermentação por microflora de queijo | αLa f104-108 | WLAHK | 77 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| ***β-Lactoglobulina*** | Tripsina | f7-9 | MKG | 71.8 | Hernández-Ledesma *et al.* (2006) |
| | Tripsina | f10-14 | LDIQK | 27.6 | Hernández-Ledesma *et al.* (2006) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f15-19 | VAGTW | 1054 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Tripsina | f22-25 | LAMA | 1062 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Tripsina | f32-40 | LDAQSAPLR | 635 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Protease N Amaro | f36-42 | SAPLRVY | 8 | Ortiz-Chao *et al.* (2009) |
| | Tripsina | f58-61 | LQKW | 34.7 | Hernández-Ledesma *et al.* (2006) |
| | Tripsina | f81-83 | VKF | 1029 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f94-100 | VLDTDYK | 946 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000); Roufik *et al.* (2007) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f102-103 | YL | 122 | Meisel (2005) |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f102-105 | YLLF | 172 | Groleau *et al.* (2003) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f106-111 | CMENSA | 788 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f142-145 | ALPM | 928 | Murakami *et al.* (2004) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f142-146 | ALPMH | 521 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Tripsina | f142-148 | ALPMHIR | 43 | Maes *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007 |
| | *Cynara Cardunculus* | f (33-42) | DAQSAPLRVY | 12,2 | Tavares (2011) |
| **α-Lactalbumina** | Termolisina | f15-26 | LKGYGGVSLPEW | 83 | Otte *et al.* (2007) |
| | Termolisina | f18-26 | YGGVSLPEW | 16 | Otte *et al.* (2007) |
| | Termolisina | f20-26 | GVSLPEW | 30 | Otte *et al.* (2007) |
| | Termolisina | f21-26 | VSLPEW | 57 | Otte *et al.* (2007) |
| | Sintético | f50-51 ou f18-19 | YG | 1522 | Mullally *et al.* (1996) |
| | Pepsina + Tripsina + Quimiotripsina | f50-52 | YGL | 409 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Pepsina | f50-53 | YGLF | 733 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | Sintético | f52-53 | LF | 349 | Chatterton *et al.* (2006) |
| | Tripsina | f99-108 | VGINYWLAHK | 327 | Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000) |
| | *Cynara Cardunculus* | f (16-26) | KGYGGVSLPEW | 0,70 | Tavares (2011) |
| | *Cynara Cardunculus* | f (97-104) | DKVGINYW | 25,4 | Tavares (2011) |

[a]Concentração de péptido necessária para inibir 50% da atividade da enzima de conversora da angiotensina.

## 1.7. Biodisponibilidade

As potenciais atividades dos péptidos bioativos dependem da capacidade destes atingirem os órgãos alvo intactos, existindo um grande número de fatores que podem afetar a sua absorção. O termo bioacessibilidade é a porção de um composto que é libertado de um alimento, ao longo da digestão gastrointestinal, tornando-se disponível para absorção e está apenas dependente da digestão e da sua libertação na matriz alimentar. De outra forma, a biodisponibilidade está relacionada com o valor nutricional dos alimentos. É definida como a quantidade de um nutriente que é digerido e absorvido e está disponível para exercer as funções metabólicas do organismo. Está dependente da digestão, da libertação na matriz alimentar, da absorção pelas células intestinais e do transporte para as células do corpo (Versantvoort *et al.*, 2004, 2005; Etcheverry *et al.*, 2012).

Embora os péptidos bioativos sejam muito promissores dadas as suas excelentes propriedades bioativas, estes podem não apresentar efeito sobre a saúde humana. As enzimas digestivas, a absorção através das proteases do trato intestinal e do sangue, podem provocar a hidrólise dos péptidos inibidores da ECA, conduzindo assim a fragmentos com menor ou maior atividade do que as suas sequências precursoras (Vermeirssen *et al.*, 2004; Tavares e Malcata, 2013). Para além disso, os péptidos podem não ser absorvidos e, portanto, não atingem a corrente sanguínea e os tecidos a um nível significativo de modo a que possam exercer efeito benéfico. Existem evidências de que os péptidos anti-hipertensivos que não são absorvidos a partir do trato digestivo podem exercer a sua função diretamente no lúmen intestinal – por exemplo, através de interação com recetores na parede intestinal (Tavares e Malcata, 2013).

A estrutura e a bioatividade dos péptidos de cadeia curta são mais facilmente preservados através da passagem gastrointestinal do que os de cadeia longa e sequências contendo resíduo (s) de Pro são geralmente mais resistentes à degradação por enzimas digestivas. Além disso, os péptidos absorvidos após digestão podem acumular-se em órgãos específicos, e exercer a sua ação de forma sistémica e gradual (Tavares e Malcata, 2013).

Para estudar a biodisponibilidade dos péptidos, os estudos nutricionais em humanos são os mais pretendidos e indicados no que respeita a questões relacionadas com a dieta, contudo os métodos *in vitro* apresentam a vantagem de serem mais rápidos, menos dispendiosos, e sem restrições éticas, permitindo a análise de um elevado número de amostras ao mesmo tempo. Sendo assim, tendo em conta a reprodutibilidade, a possibilidade de controlar as condições e a fácil amostragem, os modelos *in vitro* tornam-se bastante adequados para os estudos.

Ao longo dos anos, os métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados para a determinação da bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes a partir de

alimentos. Contudo, é necessário entender que a biodisponibilidade tem uma finalidade fisiológica ou metabólica que não pode ser totalmente quantificada pelos métodos *in vitro*. Existem fatores extrínsecos que podem influenciar a absorção de nutrientes, tais como a idade, o genótipo, o estado fisiológico de nutrientes (por exemplo, gravidez, lactação e obesidade), doenças infeciosas agudas e crónicas, a secreção de ácido clorídrico, acido gástrico e/ ou fatores intrínsecos que tornam impossível de levar em consideração ensaios *in vitro* (Sandberg, 2005; Etcheverry *et al.*, 2012).

Existem essencialmente quatro métodos *in vitro* para medir a bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade: solubilidade, dialisabilidade, modelo gastrointestinal (por exemplo, modelo gastrointestinal dinâmico *in vitro* (TIM)) e modelo de células Caco-2 (Tabela 10).

Os métodos *in vitro* baseiam-se na mimetização das condições fisiológicas *in vivo*, levando em consideração as concentração das enzimas digestivas e de sais, assim como o pH e tempo de digestão. Estando normalmente divididos em 3 fases – oral, gástrica e intestinal. Na fase oral, é adicionada α- amílase, que é uma enzima que rompe as ligações glicosídicas das moléculas de amido, isto é, em amilose e amilopectina. Na digestão gástrica, a pepsina (obtida a partir de estômago de porco) é adicionada antes da acidificação das amostras para pH 2 (para simular o pH gástrico de um adulto). A acidificação das amostras para pH 2 é importante porque a pepsina perde a sua atividade a pH ≥ 5. Antes de iniciar a digestão intestinal pela adição da pancreatina (que consiste numa mistura de enzimas pancreáticas, como a amílase pancreática, a lípase, a ribonuclease e proteases) e sais biliares (que são os emulsificantes), as amostras são neutralizadas a pH 5,5 – 6. Finalmente o pH é reajustado para 6,5 – 7 (Vardakou *et al.*, 2011; Etcheverry *et al.*, 2012).

Após estas três fases, a bioacessibilidade pode ser medida através de solubilidade, diasibilidade ou por modelos gastrointestinais. Já a biodisponibilidade pode ser avaliada através da determinação de absorção de nutrientes, transporte ou pelas células Caco-2. As células Caco-2 pertencem a uma linha celular epitelial humana derivada de um adenocarcinoma do cólon humano. No entanto, apesar de terem origem no cólon, estas células comportam-se de forma muito semelhante a culturas de células intestinais, razão que até hoje não é compreendida (Etcheverry *et al.*, 2012). As culturas celulares de células Caco-2 conseguem diferenciar-se lentamente em mono-camadas, partilhando assim muitas funções com as vilosidades epiteliais do intestino delgado (Etcheverry *et al.*, 2012).

**Tabela 10 –** Métodos *in vitro* (Etcheverry *et al.*, 2012).

| Método *in vitro* | Finalidade | Vantagens | Limitações |
|---|---|---|---|
| **Solubilidade** | Medir bioacessibilidade | • Simples<br>• Relativamente barato<br>• Uso de equipamentos acessíveis | • Não é possível avaliar a taxa de captação, de absorção ou de transporte cinético<br>• Não se pode medir nutrientes ou componentes de alimentos no local de absorção |
| **Dialisabilidade** | Medir bioacessibilidade | • Simples<br>• Relativamente barato<br>• Uso de equipamentos acessíveis | • Não é possível avaliar a taxa de captação, de absorção ou de transporte cinético<br>• Não se pode medir nutrientes ou componentes de alimentos no local de absorção |
| **Modelos gastrointestinais** | Medir bioacessibilidade No entanto, quando acoplado a células intestinais, a biodisponibilidade também pode ser medida | • Incorpora muitos parâmetros da digestão<br>• Permite a colheira em qualquer passo | • Caro<br>• Poucos estudos de validação |
| **Modelo células Caco-2** | Medir biodisponibilidade | • Permite o estudo de nutrientes ou componentes de alimentos no local de absorção | • Requer um técnico com conhecimento dos métodos de cultura de células |

Vários estudos que englobam animais hipertensos e ensaios clínicos em humanos têm demonstrado que certas sequências peptídicas podem baixar a pressão sanguínea, contudo, é difícil estabelecer uma ligação direta entre a capacidade de inibição da ECA *in vitro* e a atividade anti-hipertensiva *in vivo*. Deste modo, é importante o conhecimento do mecanismo de ação dos péptidos bioativos antes do fabrico de alimentos funcionais com características fisiológicas (Shimizu, 2004). Estudos demonstraram que alguns péptidos com capacidade de inibir a ECA e a atividade anti-hipertensiva podem ser transportados através da mucosa intestinal, via transportador $PepT_1$.

Deste modo, para que os péptidos inibidores da ECA possam exercer um efeito *in vivo*, eles não devem ser substratos da enzima. Neste sentido, os péptidos podem ser classificados em três grupos, tendo em conta o seu comportamento em relação à ECA: (1) verdadeiros inibidores, para o qual $IC_{50}$ não é modificado quando incubados com a enzima; (2) ECA-substratos, que são hidrolisados durante a incubação dando assim origem a fragmentos com uma atividade de inibição da ECA reduzida; e (3) péptidos que são convertidos em inibidores da ECA reais e ação protease digestiva. Apenas sequências

pertencentes aos grupos 1 e 3 podem mostrar um efeito anti-hipertensivo (Fujita *et al.*, 2000; Tavares e Malcata, 2013).

## 1.8. Métodos de análise, isolamento e purificação de proteínas e péptidos

Na última década verificou-se um aumento substancial do interesse na identificação de péptidos gerados por proteólise em digestões enzimáticas e/ou processos de fermentação. A identificação de péptidos bioativos em alimentos apresenta uma série de dificuldades que limitam muito o conhecimento sobre a libertação dos mesmos a partir das suas proteínas precursoras. Estas dificuldades devem-se à complexidade da matriz e à baixa concentração dos compostos a analisar, sendo por isso necessário levar a cabo etapas de purificação e concentração. A ultrafiltração é uma técnica empregue que tem bastante êxito na obtenção de frações enriquecidas de péptidos procedentes de proteínas lácteas (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000; Gómez-Ruiz *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004;). Os péptidos biologicamente ativos são normalmente pequenos. Sendo assim, pode ser útil fazer uma concentração de péptidos pela utilização de colunas de fase reversa C18 (Curtis *et al.,* 2002; Amado *et al.*, 2014; Lemes *et al.*, 2016) ou a realização de uma etapa prévia de cromatografia de exclusão molecular (Pihlanto-Leppälä *et al.,* 2000). A identificação dos péptidos é normalmente levada a cabo através da análise da extremidade N-terminal (Ryhänen *et al.,*2001; Ashar e Chand 2004; Pan *et al.,* 2005), através de espectrometria de massa combinada com a análise sequencial da extremidade N-terminal (Saito *et al.,* 2000; Minervini *et al.,* 2003; Gobetti *et al.,* 2004; Didelot *et al.,* 2006).

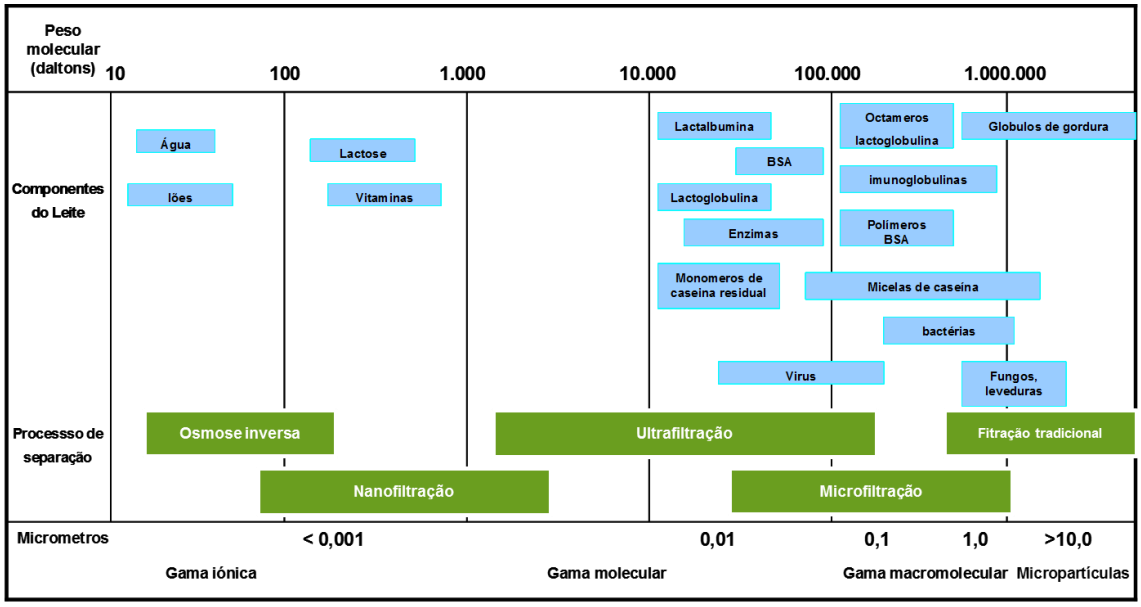
### 1.8.1. Técnicas de separação por membranas

O desenvolvimento das técnicas membranares têm sido essenciais, principalmente para a indústria alimentar, devido ao seu scale-up ser relativamente fácil, assim como o facto de se tratar de técnicas de baixo custo quando comparadas com técnicas cromatográficas (Tolkach e Kulozik, 2005). Além disso, a eliminação do tratamento térmico permite que as propriedades nutricionais e bioativas dos componentes se mantenham intactas ou levemente afetadas quando submetidas a estes tratamentos. O processo de separação por membranas é uma técnica que permite a concentração do líquido retido pela membrana, o retido, dos componentes com tamanho superior ao diâmetro do poro da membrana. O líquido que passa através da membrana, o filtrado, tem na sua composição os

componentes com tamanho inferior ao diâmetro do poro, na mesma concentração da solução inicial (Saboya e Maubois, 2000). A indústria alimentar, especialmente a de lacticínios, tem sido a pioneira no desenvolvimento de equipamentos e técnicas de filtração por membranas. As proteínas do soro podem ser recuperadas em um estado não-desnaturado através de processos de filtração já aplicados a uma escala industrial (ultrafiltração e nanofiltração) como pode ser visto na Figura 3.

Esta técnica tem um leque variado de aplicações como sendo o fracionamento de proteínas podendo levar à sua concentração e até purificação, ou mesmo à eliminação de sais ou moléculas de pesos moleculares baixos, assim como a diminuição em grande escala da carga microbiana (Figura 3) (Rektor e Vatai, 2004). A indústria láctica tem preparado uma ampla variedade de concentrados proteicos com uma pureza relativa de 35-85% de proteínas, em sólidos totais, por ultrafiltração de fluxo cruzado acompanhada de diafiltração (Vandanjon *et al.*,2007; Augustin *et al.*, 2012). Zydney (1998) considerou ainda algumas possíveis aplicações dos sistemas de membrana para o soro, podendo a ultrafiltração ser usada no controlo do conteúdo de proteínas, gordura, e lactose numa variedade de produtos lácteos. Para a obtenção de um maior rendimento na produção de queijos, a ultrafiltração atua eliminando lactose e o excesso de água e, com isso, elimina a necessidade de separar o soro do coalho, obtendo-se um produto de valor nutritivo superior, já que as proteínas incorporadas são de alto valor biológico (Hydamaka *et al.*, 2001).

**Figura 3 –** Relação entre as técnicas de filtração por membrana (intervalo do tamanho do poro da membrana) e o tamanho relativo dos vários componentes do leite (adaptado de Alfa Laval/ Tetra Pak, 1995).



### 1.8.2. Técnicas de separação cromatográficas

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que utiliza um líquido (fase móvel) para transportar a amostra através de uma coluna (fase estacionária). As técnicas de cromatografia líquida para separação de proteínas (FPLC) e HPLC, tanto analítica como preparativa são utilizadas para a separação e concentração de péptidos. Ambas as técnicas permitem a separação dos componentes de misturas complexas e fornecem informação sobre o tempo de retenção desses componentes.

No caso da cromatografia líquida, podem utilizar-se detetores de absorção atómica, ultravioleta (UV), fluorescência, ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia de massa (MS), etc. O desenvolvimento das técnicas de HPLC acopladas a espectrometria MS/MS (RP-HPLC-MS/MS) têm permitido a análise de péptidos em misturas complexas sem ser necessário proceder-se a uma separação prévia dos componentes (Abbood *et al.*, 2009).

# Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Preparação do substrato enzimático

2.2. Obtenção de concentrados peptídicos com atividade inibidora de ECA

2.3. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade

*2.4*. Tratamento estatístico

## 2.1. Preparação do substrato enzimático

### 2.1.1. Caracterização nutricional do extrato de coalho vegetal

O extrato de coalho vegetal comercial foi adquirido à empresa Enzilab, Maia, Portugal. A sua caracterização química foi efetuada através da determinação do teor em proteína, gordura, sais minerais e humidade. A proteína foi quantificada através de Kjeldahl pelo método AOAC (990.03), a gordura através do método AOAC (945.16), os sais minerais através do método AOAC (942.05) e a humidade através do método AOAC (1999).

### 2.1.2. Estabilidade enzimática do extrato de coalho vegetal

De forma a conhecer o impacto do teor de sais minerais e do processo de liofilização na estabilidade das enzimas presentes no extrato, foram efetuados alguns testes preliminares, tendo sido avaliadas as atividades coagulante e proteolítica. Deste modo, para avaliar o efeito do teor de sais minerais, as amostras foram submetidas a filtração membranar, com recurso a membranas de ultrafiltração. Para tal, em 6 membranas (Milipore, Centrifugal Filter Units) com um cut-off de 3 kDa, foram colocados 5 mL do extrato de coalho vegetal e centrifugados a 4 000 x *g* a 4 °C durante 15 min. A fração retida nas membranas foi sujeita a lavagem com $H_2O$ ultra pura, seguindo as mesmas condições de centrifugação, até que a condutividade fosse <0,5 mS/cm. No que diz respeito aos estudos do impacto de liofilização, as amostras de coalho vegetal com e sem remoção de sais minerais foram submetidas a congelação a -80 °C durante pelo menos 24 h e liofilizadas num liofilizador Cryodos, durante 48 h. Todas as amostras obtidas foram conservadas a -20 °C. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em $H_2O$ imediatamente antes do seu uso.

### 2.1.3. Extração e purificação das cardosinas

Procedeu-se à extração e purificação das cardosinas, a partir do extrato de coalho vegetal comercial líquido, sem remoção de sais minerais. O processo foi executado em 2 fases: separação de frações por pesos moleculares e por carga iónica. Na primeira fase foram testados 2 procedimentos (Figura 4) que contemplam a separação de frações com diferentes pesos moleculares utilizando membranas com diferentes cut-offs. Realizou-se um terceiro procedimento seguindo o processo tradicional descrito na literatura e validado (Veríssimo

*et al.*, 1996; Barros *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003; Barros e Malcata, 2004; Sarmento *et al.*, 2004), que consistiu na separação através de técnicas cromatográficas com uma coluna de exclusão molecular num sistema de FPLC.

No procedimento A recorreu-se a ultrafiltração membranar através do uso de uma membrana de cut-off 50 kDa. Para tal, em 8 membranas foram colocados 15 mL de extrato de coalho vegetal/membrana e centrifugados durante 15 min a 4 000 x *g* a 4 °C. Posteriormente, ao retido obtido adicionou-se 10 mL de $H_2O$ ultra pura e centrifugou-se novamente a 4 000 x *g* a 4 °C durante 15 min. Este procedimento de lavagem foi repetido as vezes necessárias para que a condutividade do retido fosse <0,5 mS/cm. A F<50 kDa obtida foi filtrada numa membrana de cut-off de 30 kDa, seguindo os mesmos passos descritos para a membrana de 50 kDa.

O procedimento B englobou apenas a ultrafiltração através de uma membrana de cut-off 30 kDa, seguindo o procedimento descrito anteriormente. Todas as frações numeradas (1-7) foram analisadas no que respeita à atividade coagulante e proteolítica (Figura 4).

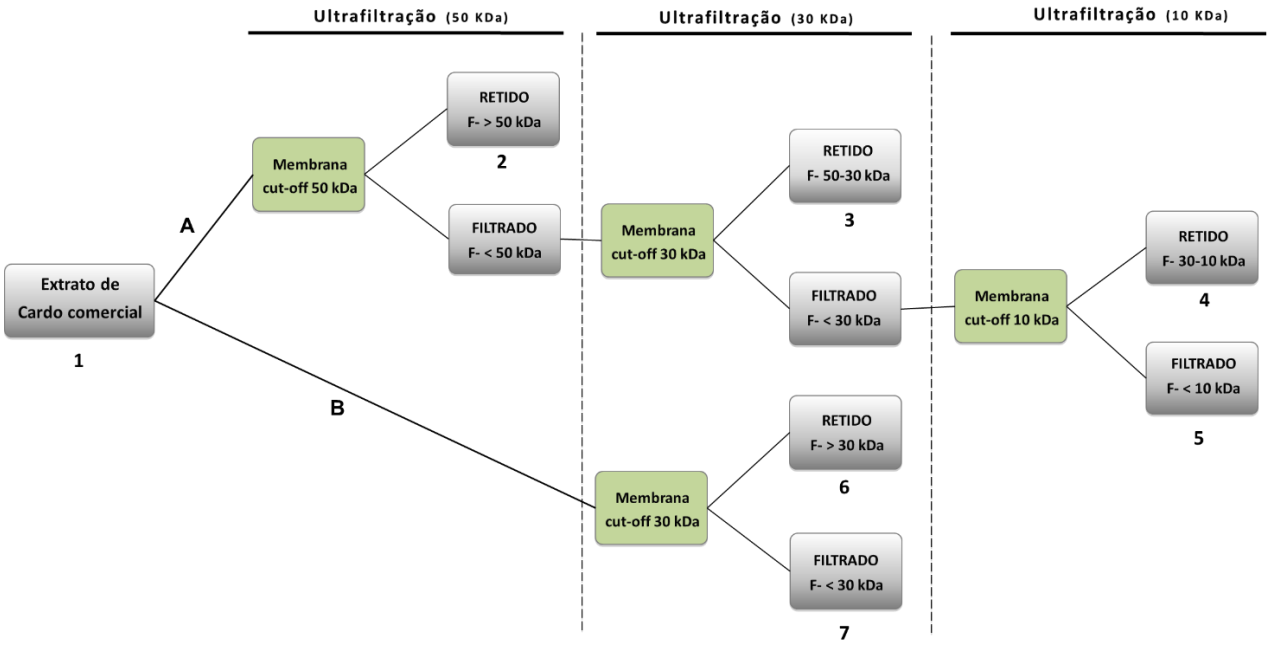



**Figura 4** – Esquema representativo dos procedimentos (A e B) de ultrafiltração membranar efetuados.

No terceiro procedimento (processo tradicional), procedeu-se à separação da cardosina A através de técnicas de cromatografia, com uma coluna de exclusão molecular

num sistema de FPLC, seguindo um protocolo descrito por Sarmento *et al.* (2004), com algumas modificações. O extrato de coalho vegetal comercial foi injetado (200 µL/injeção) numa coluna Superose 12 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7.6, as proteínas foram eluídas a um fluxo de 1,0 mL/min durante 40 min. O tampão foi filtrado com filtro 0,22 µm e desgaseificado antes da sua utilização. A deteção de proteína foi efetuada pela medição da absorvância a 280 nm. Este passo foi repetido as vezes necessárias de forma a obter a quantidade necessária de extrato parcialmente purificado. A fração resultante foi designada por F1-FPLC.

Após a primeira fase de separação por pesos moleculares, as diferentes frações obtidas por filtração membranar (F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa), juntamente com a fração obtida pelo processo tradicional (F1-FPLC) foram sujeitas a dessalinização através de membranas de ultrafiltração com um cut-off de 3 kDa, metodologia descrita na Secção 2.1.2. Um volume de 6 mL das frações ativas de cada fração foram processadas na segunda fase.

A segunda fase consistiu na passagem das amostras (500 µL/injeção) por uma coluna de troca iónica – Mono Q HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech) num sistema de FPLC, seguindo o método descrito por Sarmento *et al.* (2004) com algumas modificações. A coluna foi equilibrada em solução tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,6. A proteína foi eluída com um gradiente linear 0 – 0,4 mol/L de NaCl a um fluxo de 1,5 mL/min. As soluções foram filtradas com filtros 0,22 µm (Chm by Chmlab Group) e desgaseificadas antes da sua utilização. Os picos de absorção foram detetados pela medição da absorvância a 280 nm, tendo sido as suas frações (F1-Mono Q, F2-Mono Q e F3-Mono Q) recolhidas e conservadas a -20 °C até o seu uso. Posteriormente, determinou-se as atividades específicas, coagulante e proteolítica de todas as amostras devidamente dessalinizadas (Secção 2.1.2).

#### 2.1.3.1. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada através do método espectrofotométrico usando a caseína como substrato descrito por Kunitz (1947) com algumas modificações. A caseína (marca) 2% em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) foi submetida a hidrólise a 30 °C. A hidrólise foi iniciada pela adição de 0,1 mL de cada solução a testar com 1,9 mL de solução de caseína. Após 10 min, a reação foi parada pela adição de 1 mL de TCA 5%. Posteriormente, centrifugou-se a 15 000 x *g* a 4 °C durante 10 min e a 1 mL do sobrenadante obtido adicionou-se 2,5 mL de carbonato de sódio e 500 µL de reagente de Folin. Incubou-se a 37 °C durante 30 min. As amostras foram filtradas com filtros 0,22 µm e procedeu-se à leitura da absorvância a 660 nm contra um branco de tampão fosfato pH 6,5.

#### 2.1.3.2. Determinação da atividade coagulante

A atividade coagulante das amostras a testar foram determinadas segundo o procedimento do IDF (1992) com algumas modificações. O leite em pó desnatado (Sigma-Aldrich) foi reconstituído em $CaCl_2$ 10 mM (pH 6.5) a uma concentração final de 0,10 kg/L. As amostras a testar foram diluídas em tampão fosfato 20 mM (pH 6,5) e foram adicionados 0,2 mL a 2 mL de leite. Os tubos de ensaio foram agitados periodicamente num banho a 30 °C e o tempo da formação do primeiro coágulo foi registado. Uma unidade de coalho foi definida com a quantidade de proteína que coagula 10 mL de leite em pó reconstituído a 30 °C em 100 s (Berridge, 1945) através da seguinte fórmula:

$$\text{U/g proteína} = \frac{100}{(T \times 5)} \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{C}$$

T – tempo de formação do primeiro coágulo (segundos)

v – volume de solução de enzima adicionada (mililitros)

C – concentração da enzima (g/mL)

## 2.2. Obtenção de concentrados peptídicos com atividade inibidora de ECA

Foram produzidos concentrados peptídicos (CPep) a partir de CPS (Lacprodan, Arla Foods Ingredients, Denmark) por intermédio de hidrólise com a cardosina A, obtida por separação de membranas de ultrafiltração (Procedimento A, F>30 kDa), seguida de cromatografia líquida (coluna de troca iónica, F2-Mono Q). Para tal foi necessário proceder à otimização das condições de hidrólise.

### 2.2.1. Desenho experimental, modelação e otimização

Para a otimização das condições de hidrólise foram estudadas como variáveis independentes, a razão enzima substrato (E/S) e tempo de reação, tendo sido avaliado o seu efeito sobre o GH e a atividade inibidora da ECA, de acordo com um desenho experimental apresentado na Tabela 11. Os valores dos dois fatores de transformação foram selecionados de modo a cobrir uma ampla gama de condições ao mesmo tempo teve-se em consideração as limitações práticas industriais. Sendo assim, a razão E/S incluiu valores de 0 a 0,01% (m/m) e o tempo de reação de 0 a 7 h.

O desenho experimental foi realizado em triplicado e o substrato comercial CPS a uma concentração fixa de 40 g/L foi colocado em contacto com a fonte enzimática (extrato de cardosina A). Para tal, foi proposto um desenho composto central (DCC), que consistiu num desenho fatorial completo, com treze experiências independentes (N = 2k + 2k + n0). Das 13 experiências, 4 foram expostas por dois níveis (-1 e +1); outros 4 pontos foram axiais (a uma distância normalizada de ± √2); e os restantes 5 correspondem a pontos centrais (utilizados como estimadores de variância). Mediante o uso deste desenho experimental, as duas variáveis foram testadas a 5 níveis experimentais: 0, 0,0005, 0,0053, 0,012 e 0,01% (m/m) para a razão E/S e 0, 1, 3,5, 6 e 7 h para o tempo de reação. As experiências foram realizadas aleatoriamente.

O modelo polinomial quadrático proposto para cada variável resposta, assume a forma:

$$Y=\beta_0 + \beta_1 R + \beta_2 T + \beta_{1,1} R^2 + \beta_{2,2} T^2 + \beta_{1,2} RT + \varepsilon$$

Onde: $R$ indica a razão E/S e T o tempo de reação; $\beta_0$ a constante; $\beta_1$ e $\beta_2$ coeficientes lineares, $\beta_{1,1}$ e $\beta_{2,2}$ coeficientes quadráticos, $\beta_{1,2}$ o coeficiente de interação e ε indica o erro experimental.

**Tabela 11 –** Desenho da matriz experimental e resultados obtidos para as duas variáveis resposta estudadas, dependendo da relação enzima/substrato e tempo de reação.

**CONCENTRADO PROTEICO DO SORO**

| **Exp** | Tempo h | Razão E/S % (m/m) | GH[a] | IECA[b] <3 kDa |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 3,5 | 0,0120 | 29,9 ± 4,0 | 30,5 ± 8,4 |
| **2** | 6,0 | 0,0005 | 12,4 ± 2,1 | 31,6 ± 4,7 |
| **3** | 3,5 | 0,0053 | 21,7 ± 1,4 | 40,4 ± 6,7 |
| **4** | 3,5 | 0,0053 | 20,4 ± 0,6 | 46,1 ± 5,6 |
| **5** | 3,5 | 0,0053 | 22,2 ± 2,8 | 47,5 ± 7,0 |
| **6** | 6,0 | 0,0100 | 25,8 ± 1,4 | 24,6 ± 3,2 |
| **7** | 3,5 | 0,0053 | 20,6 ± 1,4 | 47,6 ± 5,3 |
| **8** | 3,5 | 0,0000 | 0,0 ± 0,3 | nd* |
| **9** | 0,0 | 0,0053 | 0,0 ± 0,5 | nd* |
| **10** | 7,0 | 0,0053 | 25,3 ± 1,5 | 21,9 ± 2,5 |
| **11** | 1,0 | 0,0100 | 23,8 ± 3,0 | 31,6 ± 9,0 |
| **12** | 3,5 | 0,0053 | 21,0 ± 2,4 | 41,2 ± 7,3 |
| **13** | 1,0 | 0,0005 | 4,2 ± 0,5 | 76,4 ± 9,4 |

[a] – GH – grau de hidrólise obtido pelo método de TNBS, expresso em %
[b] – atividade inibidora de ECA obtida pelo método de Sentandreu e Toldrá (2006) modificado ($IC_{50}$ expresso em μg/mL)
* - valores suprimidos para a validação do modelo estatístico aos quais não foi possível fazer tratamento estatístico para o ajuste linear dos dados pois são valores fora do limite de deteção de atividade inibidora de ECA

#### 2.2.1.1. Hidrólise enzimática

O substrato de CPS (40 g proteína/L) foi preparado com tampão citrato 100 mM (pH 5,2), seguido de agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Todas as experiências foram levadas a cabo, utilizando as condições ótimas de pH e temperatura de 5,2 e 55 °C respetivamente (Barros e Malcata, 2004). O pH foi ajustado a 5,2 com HCl 0,1 M. A razão E/S para cada experiência foi expressa com base na proteína, sabendo que o extrato enzimático possui 4,75 g proteína/L. Esta mistura foi incubada a 55 °C durante 7 h, e as amostras foram retiradas ao fim de 0, 1, 3,5, 6 e 7 h (Tabela 11). A reação foi parada colocando as amostras num banho a 95 °C durante 15 min. Os hidrolisados foram centrifugadas a 16 000 × *g* a 4 °C durante 15 min, e os sobrenadantes foram congelados a -20 °C. Uma porção do referido sobrenadante foi submetido a ultrafiltração através de uma membrana cut-off 3 kDa, obtendo-se desta forma as frações maior e menor que 3 kDa. As frações obtidas foram liofilizadas, tal como referido na Secção 2.1.2 e mantidas a -20 °C até sua utilização. As frações liofilizadas foram reconstituídas em água destilada antes da caracterização analítica. Foi determinado o $IC_{50}$ das amostras obtidas após ultrafiltração: <3 kDa e >3 kDa.

#### 2.2.1.2. Determinação do grau de hidrólise

O GH foi quantificado através da medição do aumento de grupos amina livres, utilizando o TNBS (Sigma-Aldrich), de acordo com McKellar (1981) com algumas modificações.

A cada amostra (0,050 mL) adicionou-se 0,5 mL de tampão borato de potássio 1 M (pH 9,2) e 0,2 mL de uma solução TNBS 0,015% (m/v). As amostras foram incubadas a 25 °C durante 30 min no escuro. De seguida, a reação foi parada pela adição de 0,2 mL de $Na_2HPO_4$ 2 M (Sigma-Aldrich), contendo $Na_2SO_3$ 18 mM (Sigma-Aldrich) e mediu-se a absorvância espectrofotometricamente a 420 nm num espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1800). Paralelamente, seguindo o mesmo procedimento experimental preparou-se uma curva padrão entre 0-2,0 mM de L-Leucina (Sigma-Aldrich), de forma a converter as absorvâncias obtidas em $\mu mol_{grupos\ amina\ livres/}mL$. A Figura 5 ilustra a reação catalisada pelo TNBS quando em contacto com os grupos α-amina livres.

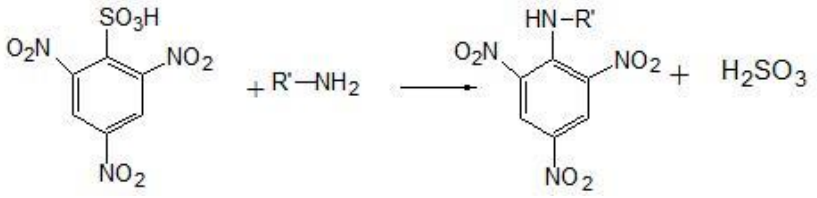



**Figura 5 –** Reação catalisada pelo TNBS quando em contacto com grupos α-amina livres (Kale e Bajaj, 2010).

A intensidade da cor e a concentração de grupos α-amina existentes beneficiam de uma relação linear, pelo que é possível relacionar indiretamente, a absorvância com o grau de hidrólise. O ensaio é realizado sob condições ligeiramente alcalinas e a reação é parada pelo abaixamento de pH. O grau de hidrólise é dado pela fórmula:

$$\mathrm{GH}\ (\%) = 100\left(\frac{\mathrm{AN_2\text{-}AN_1}}{\mathrm{Npb}}\right)$$

*AN1*: Conteúdo de azoto do substrato proteico antes da hidrólise (mg/g proteína)
*AN2*: Conteúdo de azoto do substrato proteico após hidrólise (mg/g proteína)
*Npb*: Conteúdo de azoto das ligações peptídicas no substrato (mg/g proteína)

No caso das proteínas de soro de leite, foi usado um valor de Npb de 123,3 (Adler-Nissen, 1979). Os valores de $AN_1$ e $AN_2$ foram obtidos por referência à curva padrão acima mencionada, e, em seguida, divididos pelo teor de proteína, de modo a obter $mg_{\text{amino azoto}}/g$ proteína. Todas as medições foram realizadas em duplicado.

### 2.2.1.3. Avaliação da atividade inibidora da ECA

A atividade inibidora da ECA foi avaliada de acordo com o método fluorimétrico descrito por Sentandreu e Toldrá (2006), com algumas modificações. A extração e preparação da ECA a partir de pulmão de coelho em pó (Sigma-Aldrich) foi efetuada por ressuspensão de 1 g em 10 mL de tampão Tris-HCl 150 mM, contendo 5% (v/v) de glicerol a pH 8,3. A mistura foi conservada com agitação a 4 °C durante a noite e centrifugada a 14 000 x *g* a 4 °C até se obter um sobrenadante vermelho transparente que foi recolhido e armazenado a -20 °C (~ 2.000 U/L) (Murray *et al.*, 2004). Para a preparação das soluções de trabalho, a solução de ECA inicial foi diluída 1/5 com tampão Tris-HCl 150 mM, pH 8,3, contendo 1 µM de $ZnCl_2$ 0,1 mM. O substrato fluorescente de 0,45 mM foi preparado dissolvendo o Abz-Gly-Phe(NO2)-Pro (Bachem, Torrance, USA), em 150 mM de tampão

Tris-HCl (pH 8,3) contendo 1,125 M de NaCl.

O método foi efetuado em microplaca de 96 poços (96F não tratada, NuncTM, Dinamarca). A atividade de cada amostra foi testada em triplicado, e paralelamente foram feitos controlo positivo e negativo, assim como brancos da amostra em duplicado. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 160 µL de substrato fluorescente a 40 µL de amostra e 40 µL de enzima, a mistura foi imediatamente homogeneizada e incubada a 37 °C. A fluorescência foi medida aos 0, 15 e 30 min num leitor de microplacas Biotek HT, com filtros de 350 nm de excitação e de 420 nm de emissão. O software utilizado foi o Gen 5 2.01.

A atividade inibidora da ECA foi calculada como a quantidade de proteína necessária para inibir 50% da enzima ($IC_{50}$) (µg de proteína/mL). Para tal, foi feito um ajuste não linear dos dados, com o software GraphPad Prism 5, e os dados foram expressos como médias ± DP (n = 3).

Para calcular a atividade inibidora de cada amostra utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\%\ \text{Atividade inibidora} = \frac{(F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}) - (F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco amostra}})}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100$$

*Fcontrolo:* Fluorescência emitida pelo grupo *o*-aminobenzoilglicina através da acção da ECA sobre o substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO2)-Pro sem inibidor

*Fbranco:* Fluorescência emitida pelo substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO2)-Pro

*Famostra:* Fluorescência emitida pelo grupo *o*-aminobenzoilglicina através da ação da ECA sobre o substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO2)-Pro na presença de inibidor

*Fbranco amostra:* Fluorescência emitida pelo substrato fluorescente Abz-Gly-Phe(NO2)-Pro na presença de inibidor

## 2.3. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade

### 2.3.1. Digestão e absorção *in vitro*

O CPS e o CPep (concentrado peptídico com atividade inibidora da ECA obtido na Secção 2.2) foram caracterizados em termos de bioacessibilidade e biodisponibilidade.

O procedimento de digestão *in vitro* usando um modelo estático foi realizado de acordo com o método normalizado internacionalmente (Minekus et al., 2014). O método consiste em três etapas sequenciais: uma digestão inicial com α-amílase para simular a fase oral, seguido por uma digestão com HCl juntamente com pepsina de forma a mimetizar a fase gástrica e, por fim, os sais biliares/pancreatina para simular digestão intestinal (Figura 6). A estabilidade dos péptidos bioativos à digestão foi avaliada pela variação do valor de

$IC_{50}$ da atividade inibidora de ECA antes e após o tratamento. O estudo de absorção *in vitro* foi efetuado por intermédio das células Caco-2.

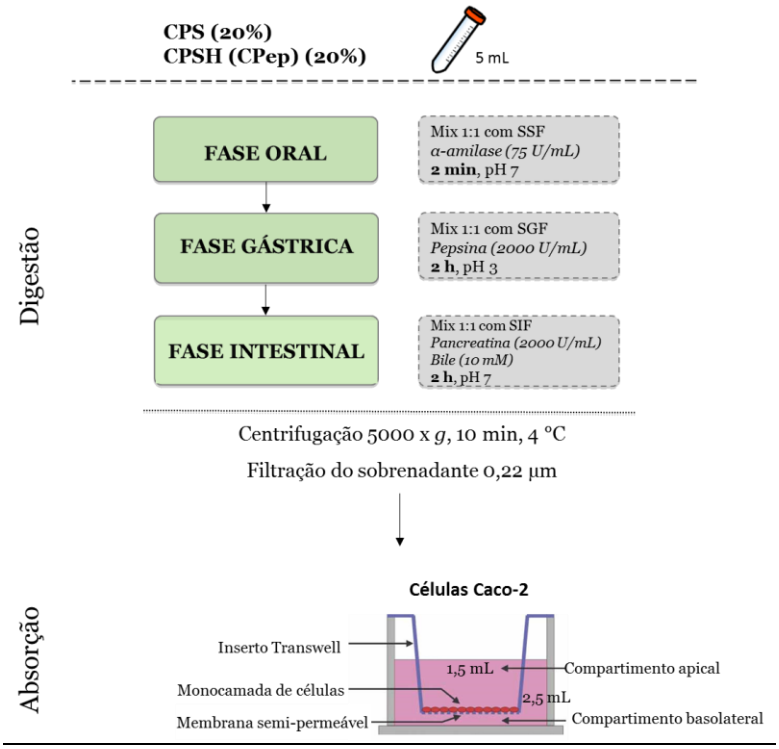



**Figura 6 –** Visualização geral do procedimento de digestão *in vitro* das diferentes amostras, assim como do estudo da absorção *in vitro* através de células Caco-2.

Na fase oral, a cada 5 mL de amostra (CPS ou CPep) misturaram-se 3,5 mL de solução de FSS (fluido salivar simulado). A esta mistura adicionou-se 0,5 mL de uma solução de α-amílase 1500 U/mL (α-amílase de saliva humana tipo IX-A, 1000-3000 U/mg proteína, Sigma), 25 µL de $CaCl_2$ 0,3 M e 975 µL de $H_2O$. Incubou-se a mistura a 37 °C durante 2 min. Todos os reagentes foram pré-aquecidos a 37 °C.

Seguiu-se a simulação da fase gástrica misturando-se 10 mL do bolo salivar obtido na fase oral com 7,5 mL de solução de FGS (fluido gástrico simulado), 1,6 mL de solução de pepsina 25 000 U/mL (pepsina de mucosa gástrica de porco 3200-4500 U/mg proteína, Sigma) e 5 µL de $CaCl_2$ 0,3 M. Ajustou-se o pH a 3,0 com HCl 1 M. Seguidamente a solução de FGS foi diluída com a adição de 0,695 µL de $H_2O$. Incubou-se a mistura a 37 °C durante 2 h com agitação.

No que diz respeito à fase intestinal, misturou-se 20 mL de quimo gástrico obtido anteriormente com 11 mL de solução de FIS (fluido intestinal simulado). A esta mistura adicionou-se 5,0 mL de uma solução de pancreatina 800 U/mL (pancreatina de pâncreas de porco, Sigma), 2,5 mL de bile fresca (160 mM na bile fresca), 40 µL de $CaCl_2$ 0,3 M, 0,15 mL de NaOH 1 M até atingir o pH 7,0 e 1,31 mL de $H_2O$. A digestão intestinal ocorreu

durante 2 h a 37 °C. Verificou-se o pH no decorrer na digestão e procedeu-se ao reajuste quando necessário.

O fluido obtido na fase intestinal foi centrifugado a 5 000 x *g* durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado com filtros de 0,22 μm e designado como "Após digestão" foi usado no estudo de absorção tendo-se colocado em contacto com culturas celulares de células Caco-2.

As células Caco-2 (passagem nº18) foram obtidas a partir da coleção do Grupo de investigação de Química-Física Molecular da Universidade de Coimbra. Foram cultivadas em DMEM (meio de eagle modificado por dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de uma solução de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina e 1% de solução GlutaMAX™. As células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de $CO_2$. O meio de cultura foi mudado a cada dois dias e as células foram passadas a 60% de confluência celular, tendo sido usadas na passagem 54. Para esta experiência, as células Caco-2 foram semeadas a uma densidade de $1x10^5/cm^2$ em placas Transwell 24 mm de 6 cavidades com um tamanho de poro de 0,4 mm e uma área de crescimento de 4,67 $cm^2$ (Corning Incorporated, NY, USA). O meio de cultura foi mudado a cada 2 dias e a experiencia foi levada a cabo 21 dias após as células terem sido semeadas. As monocamadas de células Caco-2 com uma integridade equivalente a uma resistência elétrica transepitelial (RET) maior que 1000 $\Omega/cm^2$ foram consideradas para os estudos de transporte (Melo *et al.,* 2016). Durante as experiências de transporte, as células Caco-2 foram expostas no compartimento apical às amostras resultantes da simulação da digestão gástrica. A experiência foi realizada, usando 1,5 mL de amostra (diluída ½) no compartimento apical e 2,5 mL de meio de transporte de uma solução-tampão salina de Hank (HBSS) no basolateral. Após 120 min, foram obtidas alíquotas a partir do compartimento apical e basolateral, tendo sido designadas como as amostras "Apical" e "Basolateral" respetivamente. Determinaram-se as concentrações iniciais de proteína nas amostras de tratamento e as concentrações finais no compartimento apical e basolateral pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA). Os valores da RET foram também determinados no final da experiencia após lavagem com HBSS da monocamada. Todos os ensaios de transporte foram realizados em triplicado.

Todas as amostras recolhidas, após digestão, fração apical e fração basolateral das células foram analisadas relativamente à atividade inibidora de ECA.

## 2.4. Tratamento estatístico

Os resultados experimentais do DCC foram analisados por meio de regressão linear múltipla (RLM). A avaliação da qualidade do ajuste foi feita por análise de variância (ANOVA) quando verificada uma distribuição normal. O desenho experimental, análise de dados e de superfícies de resposta foram realizadas pelo Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., MD, USA), o qual permite a criação e análise de desenhos experimentais.

Para os restantes resultados experimentais, todas as variáveis dependentes no que se refere à distribuição de resíduos, foram analisados através do teste Shapiro-Wilk. Se a distribuição dos resíduos confirmaram uma distribuição normal, a comparação de diferentes grupos (n>2) foi realizada através da ANOVA unidirecional. Quando se verificou homogeneidade das variâncias, as médias foram comparadas pelo teste post-hoc de Duncan. A correção de Welch foi aplicada quando não se verificou a homogeneidade das variâncias. Neste caso, sempre que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, as médias foram comparadas pelo teste post-hoc T3-Dunnet. A comparação de 2 grupos foi realizada através do teste *t*-Student. Se a distribuição dos resíduos não apresentou distribuição normal, a comparação de diferentes grupos, foi feita usando o teste Kruskal–Wallis. Sempre que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, as medianas foram comparadas pelo teste post-hoc Mann–Whitney. As análises estatísticas foram efetuadas para um nível de significância de $p<0,05$, usando o software SPSS versão 23.0 (IBM Corporation, New York, EUA).

# Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Preparação do substrato enzimático

3.2. Obtenção de concentrados peptídicos com atividade inibidora de ECA

3.3. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade

# 3.1. Preparação do substrato enzimático

## 3.1.1. Caracterização nutricional do extrato de coalho vegetal

A etapa inicial do trabalho envolveu a caracterização química do extrato de cardo comercial. Os resultados obtidos para o teor em proteína, gordura, sais minerais e humidade estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12 –** Composição nutricional do extrato de cardo comercial.

| | **Percentagem (%)** |
|---|---|
| **Proteína** | 6,3 ± 0,2 |
| **Gordura** | 0,09 ± 0,02 |
| **Sais** | 50,8 ± 1,1 |
| **Humidade** | 5,2 ± 0,8 |

O extrato de C. *cardunculus* apresenta um baixo teor de gordura e níveis elevados de sais minerais. O facto do teor de gordura ser residual, pode dever-se ao baixo teor lipídico presente na planta (Christaki *et al.*, 2012) e também ao facto da extração realizada para obtenção do extrato ser usualmente aquosa (com a utilização de soluções tampão) (Silva *et al.*, 2003; Barros e Malcata, 2004), onde as gorduras são imiscíveis. O uso de soluções tampão leva a um aumento considerável da percentagem de sais minerais.

## 3.1.2. Estabilidade enzimática do extrato de coalho vegetal

Os resultados referentes ao estudo da estabilidade das enzimas presentes no extrato, relativamente ao teor de sais minerais e ao processo de liofilização estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13 –** Atividade enzimática dos extratos de cardo comercial (ECC) líquido e liofilizado, com e sem remoção de sais minerais.

| **Atividade específica*** | | | |
|---|---|---|---|
| | **Coagulante (c)**[a] | **Proteolítica (*p*)**[b] | **Relação *c*/*p***[b] |
| | (U/mg) | (µmoles tirosina/mg/min) | (U*µmoles tirosina/min) |
| **ECC líquido** | 4,71 ± 0,54 a | 0,53 ± 0,06 a | 8,32 ± 0,65 a |
| **ECC liofilizado** | 4,25 ± 0,19 b | 0,51 ± 0,04 a | 8,31 ± 0,65 a |
| **ECC líquido sem sais** | 4,58 ± 0,46 ab | 0,54 ± 0,09 a | 8,92 ± 0,62 a |
| **ECC liofilizado sem sais** | 4,28 ± 0,44 ab | 0,50 ± 0,08 a | 9,14 ± 0,11 a |

*média ± desvio padrão (n=6)
ECC – extrato de cardo comercial
Diferentes letras minúsculas numa coluna mostram diferenças estatisticamente significativas ($p$<0,05) entre as médias
[a]Medianas comparadas pelo teste Mann-Whitney após análise Kruskal Wallis
[b]Análise ANOVA unidirecional com correção de Welch (homogeneidade de variâncias não confirmada pelo teste de Levene ($p$<0,05))

Quanto à atividade coagulante, a análise estatística efetuada para comparar os valores entre os diferentes extratos (liofilizado, não liofilizado, com e sem remoção de sais minerais), permitiu concluir que há diferenças estatisticamente significativas apenas entre o extrato de cardo comercial (ECC) líquido e liofilizado ambos contendo sais minerais ($p$<0,01). Sendo o cardo líquido o que apresenta maior atividade coagulante, embora a diferença não seja muito expressiva. No que diz respeito à atividade proteolítica, os extratos não apresentam diferenças significativas entre si ($p$>0,05). A relação entre a atividade coagulante e a atividade proteolítica ($c/p$) é um indicador muito útil quando nos referimos à adequação das proteases a serem utilizadas na produção de queijo, tendo sido por isso calculada. Desta forma, a análise dos resultados ($p$>0,05), permite concluir que a liofilização dos extratos e a presença de sais minerais, não afetam o desempenho das suas proteases. Em parte estes resultados, corroboram com os obtidos por Tavaria *et al.* (2001) que apontam para uma estabilização das enzimas no extrato de *C. cardunculus* quando liofilizado e ressuspendido em tampão citrato, verificando-se um aumento da sua atividade coagulante e proteolítica em comparação com extrato líquido mantido em condições de refrigeração (4 °C).

### 3.1.3. Extração e purificação das cardosinas

Dado o crescente interesse de aplicação das cardosinas, nomeadamente como catalisadores da síntese de péptidos (Sarmento *et al.*, 2009) e tendo em vista uma futura aplicação na indústria alimentar, foram estudados métodos alternativos, potencialmente mais rápidos, eficientes e/ou economicamente mais rentáveis para a sua extração e purificação.

### 3.1.3.1. Ultrafiltração membranar

Os métodos descritos na literatura (Veríssimo *et al.*, 1996; Barros *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003; Barros e Malcata, 2004; Sarmento *et al.*, 2004) para a separação das cardosinas, indicam 2 passos principais de separação. O primeiro através de coluna de exclusão de peso molecular, e o segundo através de uma coluna de troca iónica. No entanto, verificou-se que estes possuem rendimentos muito baixos. Como foi referido, visando o aumento de rentabilidade do processo, nomeadamente no que respeita a custos e tempo de obtenção, uma possível alternativa em estudo foi a ultrafiltração membranar para a substituição do primeiro passo de separação. Sendo assim, tal como descrito na secção 2.1.3 do Capítulo 2, foram testados 2 métodos (Figura 4). Os resultados referentes à atividade coagulante e proteolítica das amostras analisadas encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14 –** Atividade enzimática do extrato de cardo comercial (ECC) e das frações obtidas por ultrafiltração.

| **Atividade específica*** | | | |
|---|---|---|---|
| | **Coagulante (*c*)[a]** | **Proteolítica (*p*)[a]** | **Relação *c*/*p*[a]** |
| | (U/mg) | (μmoles tirosina/mg/min) | (U*μmoles tirosina/min) |
| **1 – ECC** | 4,66 ± 0,51 a | 0,53 ± 0,07 a | 8,32 ± 0,65 a |
| **2 - F>50 kDa** | 8,03 ± 0,62 b | 1,04 ± 0,11 b | 8,27 ± 0,28 a |
| **3 - F50-30 kDa** | 8,45 ± 0,08 b | 0,86 ± 0,14 bc | 9,95 ± 1,02 a |
| **4 - F30-10 kDa** | 1,03 ± 0,18 c | 0,24 ± 0,01 d | 4,45 ± 0,32 b |
| **5 - F<10 kDa** | nd | nd | nd |
| **6 - F>30 kDa** | 8,17 ± 0,30 b | 0,78 ± 0,06 c | 10,39 ± 0,83 a |
| **7 - F<30 kDa** | 1,47 ± 0,10 d | 0,14 ± 0,02 d | 6,02 ± 0,16 c |

*média ± desvio padrão (n=6)

ECC – extrato de cardo comercial

nd – não detetado

Diferentes letras minúsculas numa coluna mostram diferenças estatisticamente significativas ($p$<0,05) entre as médias

[a]Médias comparadas pelo teste T3-Dunnet, após análise ANOVA unidirecional com correção de Welch ($p$<0,001) (homogeneidade de variâncias não confirmada pelo teste de Leven

Tendo em consideração o peso molecular das cardosinas A e B presentes no extrato de coalho vegetal (46 e 48 kDa) e tal como esperado, os resultados para ambas as atividades mostram que, as frações correspondentes aos concentrados F50-30 kDa e F>30 kDa, apresentam valores significativamente diferentes da F30-10 kDa e F<30 kDa – cerca de 8 vezes superior para a atividade coagulante e 5 a 6 vezes superior para a atividade proteolítica. No entanto, verifica-se o mesmo comportamento para a F>50 kDa; isto poderá ser justificado pelo facto do peso molecular das cardosinas ser muito próximo do limite do cut-off da membrana levando a que algumas proteínas permaneçam na fração retida

nomeadamente a cardosina B que é a que apresenta maior peso molecular e maior atividade específica quando comparada com a A.

No que se refere à atividade coagulante pode verificar-se que as 3 frações que apresentam maior atividade (F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa) não apresentam diferenças significativas entre elas. No entanto, quando comparadas com o extrato de cardo comercial, apresentam um aumento na ordem dos 53% da atividade. O mesmo sucede na análise da atividade proteolítica, para a qual F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa, apresentam valores de atividade superiores quando comparadas com o extrato de cardo comercial ca. 49%, 38% e 32% respetivamente. No caso da atividade proteolítica verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as F>50 kDa e F>30 kDa. No entanto, não se verificam diferenças entre as F>50 kDa e F50-30 kDa, nem entre as F>30 kDa e F50-30 kDa. Como a diferença não é acentuada, cerca de 15%, poderá estar relacionada com o teor em enzimas proteolítica e não proteolítica da F>50 kDa e F>30 kDa respetivamente, a qual está diretamente implicada na determinação da atividade específica.

Da análise da relação *c*/*p* os resultados corroboram com os apresentados acima para a actividade coagulante e proteolítica, no que se refere às frações que apresentaram maior atividade, tendo-se também verificado que a F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa não apresentam diferenças estatisticamente significativas relativamente ao extrato de cardo comercial.

#### 3.1.3.2. Cromatografia líquida

##### *3.1.3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular*

Como foi mencionado na secção 2.1.3, paralelamente ao estudo da filtração por membranas, foi efetuado o processo tradicional descrito na literatura e validado para a primeira fase de separação no processo de purificação das cardosinas. Este consiste num método de cromatografia líquida cuja separação se processa através de uma coluna de exclusão molecular num sistema de FPLC. Os cromatogramas do extrato de cardo comercial e de uma solução padrão de pesos moleculares de proteína obtidos são apresentados na Figura 7.

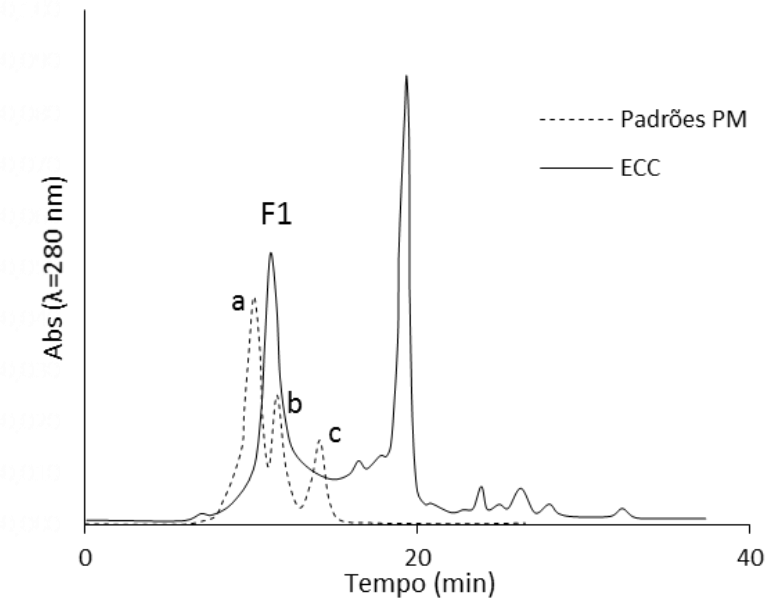



**Figura 7 –** Perfil de eluição do extrato de cardo comercial onde foi recolhida a Fração 1 (F1), e de um padrão de pesos moleculares de proteína (a – albumina sérica bovina, b – β-lactoglobulina e c – mioglobina, num sistema de FPLC (coluna Superose 12 HR 10/30).

Os resultados mostram que a Fração 1 (F1), a qual apresenta um volume de eluição de 15,8 mL é a que contém as cardosinas, por comparação com a injeção de padrões de peso molecular de proteínas (albumina sérica bovina com 66 kDa e volume de eluição 14,6 mL, β-lactoglobulina com 35 kDa e volume de eluição de 17,3 mL e mioglobina com 17 kDa e volume de eluição de 20,6 mL).

#### *3.1.3.2.2. Cromatografia de troca iónica*

As diferentes frações obtidas por filtração membranar (F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa), juntamente com a fração obtida pelo processo tradicional (F1-FPLC) foram sujeitas a dessalinização e submetidas à passagem numa coluna de troca iónica (Mono Q) num sistema de FPLC. Os respetivos cromatogramas são apresentados na Figura 8.

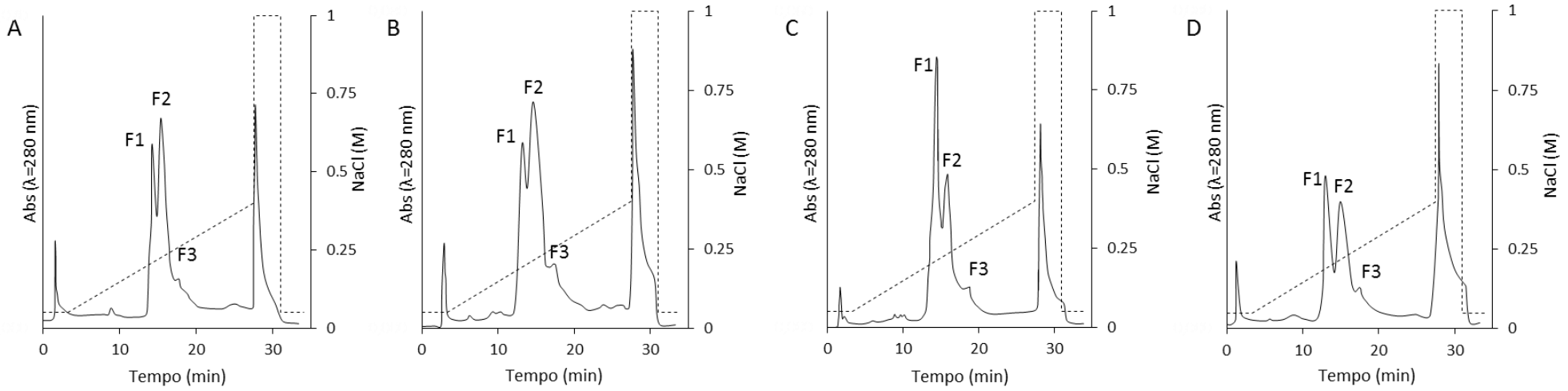



**Figura 8 –** Cromatogramas obtidos por FPLC (coluna Mono-Q HR 5/5), das frações A – F1-FPLC; B – F>50 kDa; C – F50-30 kDa e D – F>30 kDa.

Pelos perfis cromatográficos obtidos a 280 nm pode verificar-se que não existem diferenças significativas no perfil proteico, apenas diferentes intensidades dos picos, nomeadamente da Fração 2 (F2) correspondente à cardosina A, o que está relacionado com o intervalo de valores dos pesos moleculares das diferentes frações (Veríssimo *et al.*, 1996; Sarmento *el al.*, 2009).

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados obtidos para as atividades específicas, coagulante e proteolítica das Frações 1, 2 e 3 (F1, F2 e F3) obtidas após a passagem na coluna Mono Q para cada uma das amostras injetadas.

**Tabela 15 –** Atividade enzimática específica (atividade coagulante) das frações antes e após separação por coluna Mono Q.

| **Atividade coagulante*** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **F1-FPLC** | **F>50 kDa** | **F50-30 kDa** | **F>30 kDa** | *p* |
| **F-inicial** | 11,7 ± 0,15 aA | 8,03 ± 0,62 acB | 8,45 ± 0,080 aC | 8,17 ± 0,30 aBC | < 0,001 |
| **F1-Mono Q** | 7,20 ± 0,41 bA | 2,59 ± 0,040 bB | 1,34 ± 0,050 bC | 2,91 ± 0,45 bB | < 0,001 |
| **F2-Mono Q** | 16,4 ± 1,0 cA | 7,81 ± 0,29 aB | 9,39 ± 0,73 cC | 9,30 ± 0,86 acC | < 0,001 |
| **F3-Mono Q** | 15,6 ± 0,42 cA | 8,31 ± 0,10 cB | 8,09 ± 0,70 aB | 9,74 ± 0,26 cC | < 0,001 |
| *p* | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | |

*em U/mg (média ± desvio padrão) (n=6)

Diferentes letras minúsculas/maiúsculas respetivamente em coluna e em linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p$<0,05) entre as médias

Valores de $p$ para a análise ANOVA unidirecional com correção de Welch (homogeneidade de variâncias não confirmada pelo teste de Levene ($p$ <0,05), médias comparadas pelo teste T3-Dunnet

**Tabela 16 –** Atividade enzimática específica (atividade proteolítica) das frações antes e após separação por coluna Mono Q.

| **Atividade proteolítica*** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **F1-FPLC** | **F>50 kDa** | **F50-30 kDa** | **F>30 kDa** | *p* |
| **F-inicial** | 1,20 ± 0,19 aA | 1,04 ± 0,11 aAB | 0,86 ± 0,14 aBC | 0,78 ± 0,06 abC | < 0,001 |
| **F1-Mono Q** | 0,71 ± 0,07 bA | 0,81 ± 0,06 bAB | 0,23 ± 0,02 bC | 0,6 ± 0,11 aAC | < 0,001 |
| **F2-Mono Q** | 1,53 ± 0,13 acA | 1,25 ± 0,13 cB | 1,25 ± 0,03 cB | 0,97 ± 0,13 bC | < 0,001$^{+}$ |
| **F3-Mono Q** | 1,63 ± 0,13 cA | 1,26 ± 0,05 cB | 1,14 ± 0,16 acB | 0,99 ± 0,14 bB | < 0,001 |
| *p* | < 0,001 | < 0,001$^{+}$ | < 0,001 | < 0,001 | |

*expressa em U*µmoles tirosina/min (média ± desvio padrão) (n=6)

Diferentes letras minúsculas/maiúsculas respetivamente em coluna e em linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p$<0,05) entre as médias

Valores de $p$ para a análise ANOVA unidirecional (homogeneidade de variâncias confirmada pelo teste de Levene ($p$>0,05)), médias comparadas pelo teste de Duncan

Valores de $^{+}p$ para a análise ANOVA unidirecional com correção de Welch (homogeneidade de variâncias não confirmada pelo teste de Levene ($p$<0,05), médias comparadas pelo teste T3-Dunnet

Através da análise dos resultados (Tabelas 15 e 16) verifica-se para todos os casos, que a F1-Mono Q quando comparada com F2/F3-Mono Q da mesma amostra e a fração inicial, apresenta valores mais baixos para ambas as atividades específicas. No que se refere à comparação da F2-Mono Q e F3-Mono Q, de uma forma geral não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Quando comparadas as amostras iniciais (antes da injeção na coluna Mono Q) resultantes dos procedimentos de filtração membranar com a obtida pelo método tradicional observou-se que a última apresenta maior atividade coagulante e proteolítica em cerca de 30%, exceto quando comparada com a F>50 kDa (para a atividade proteolítica), com a qual não se verificam diferenças significativas. Do mesmo modo as 2 frações resultantes da coluna Mono Q com maior atividade (F2 e F3 Mono Q) quando comparadas mantêm a mesma tendência.

Relativamente à atividade coagulante, a F2-Mono Q (F1-FPLC) apresenta valores superiores aos apresentados pela F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa, de 52%, 43% e 43% respetivamente, assim como a F3-Mono Q (F1-FPLC) que apresenta valores superiores aos apresentados pela F>50 kDa, F50-30 kDa e F>30 kDa de 47%, 48% e 38% respetivamente; o mesmo acontece para a atividade proteolítica, no entanto com valores de % de perda de atividade mais baixas.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos para todas as frações, efetuou-se a razão atividade coagulante e proteolítica *(c/p)* e os resultados são apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17 –** Relação entre a atividade coagulante e a atividade proteolítica das frações resultantes da separação por coluna Mono Q e da fração injetada.

| **Relação c/*p**** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **F1-FPLC** | **F>50 kDa** | **F50-30 kDa** | **F>30 kDa** | *p* |
| **F-inicial** | 9,89 ± 1,48 | 8,27 ± 0,28 a | 9,95 ± 1,02 a | 10,39 ± 0,83 a | 0,113 |
| **F1-Mono Q** | 10,14 ± 0,45 A | 3,22 ± 0,21 bB | 5,62 ± 0,31 bC | 5,17 ± 0,38 bC | < 0,001 |
| **F2-Mono Q** | 10,72 ± 0,25 A | 6,27 ± 0,36 cB | 7,49 ± 0,19 aC | 9,35 ± 0,09 aD | < 0,001 |
| **F3-Mono Q** | 9,62 ± 0,55 A | 6,73 ± 0,07 cB | 6,81 ± 0,11 cB | 9,97 ± 1,27 abAB | 0,005⁺ |
| *p* | 0,462 | < 0,001⁺ | 0,002⁺ | 0,001⁺ | |

*expressa em U*µmoles tirosina/min (média ± desvio padrão) (n=6)

Diferentes letras minúsculas/maiúsculas respetivamente em coluna e em linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p$<0,05) entre as médias

Valores de $p$ para a análise ANOVA unidirecional (homogeneidade de variâncias confirmada pelo teste de Levene ($p$>0,05)), médias comparadas pelo teste de Duncan

Valores de $^{+}p$ para a análise ANOVA unidirecional com correção de Welch (homogeneidade de variâncias não confirmada pelo teste de Levene ($p$<0,05), médias comparadas pelo teste T3-Dunnet

Através da análise dos resultados da razão atividade coagulante e proteolítica (*c/p*) verifica-se que as frações iniciais obtidas por filtração membranar não apresentam diferenças com a obtida pelo método tradicional, no entanto para o segundo passo de purificação (coluna Mono Q), verificam-se diferenças entre as frações obtidas, sendo a F>30 kDa a que apresenta melhores resultados. Sendo assim, e uma vez que o método de ultrafiltração por membranas é muito menos moroso do que o método tradicional de cromatografia líquida, optou-se por substituir a primeira fase (coluna de exclusão molecular) do método tradicional de obtenção das cardosinas por ultrafiltração em membrana de 30 kDa, seguida de dessalinização e passagem para a segunda fase (coluna de troca iónica) para a obtenção das cardosinas. Isto facilmente se pode verificar, comparando os volumes de injeção da coluna de exclusão molecular versus o tempo de eluição por injeção (200 µL/40 min (tempo de separação)) e capacidade de separação das colunas de ultrafiltração versus o tempo de centrifugação (8x15 mL/60 min (tempo de separação com dessalinização))

## 3.2. Obtenção de concentrados peptídicos com atividade inibidora de ECA

### 3.2.1. Desenho experimental, modelação e otimização

A otimização das condições de hidrólise do CPS através do extrato enzimático de cardosina A foi realizada seguindo a metodologia descrita no Capítulo 2 (Secção 2.2.1). A razão E/S (m/m) e o tempo de reação (h) são as principais variáveis que afetam a hidrólise enzimática (Contreras *et al.*, 2011). Deste modo, estudou-se a influência destes dois fatores sobre o GH e sobre a atividade inibidora da ECA. Uma vez que a atividade inibidora da ECA depende consideravelmente do GH do substrato proteico (Tavares *et al.*, 2011), caso os resultados obtidos para esta atividade sejam apenas uma consequência da hidrólise extensa, das propriedades intrínsecas do substrato ou da especificidade da enzima, pode considerar-se o GH um parâmetro útil sobre o estudo da atividade anti-hipertensiva.

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 11, no que se refere à avaliação do GH no sistema modelo em estudo, pode concluir-se que, a hidrólise pela ação da cardosina A mesmo com uma concentração 4 vezes inferior ao extrato de cardo comercial (utilizado para o estudo do grau de hidrólise sobre o mesmo CPS (Tavares *el al.*, 2011a)) apresenta valores superiores, uma vez que com o extrato de cardo se atingem valores

máximos de hidrólise do CPS de cerca de 16%. Verifica-se também uma variação positiva com o aumento do tempo de reação e da relação E/S.

Quanto à atividade inibidora da ECA, os resultados foram expressos através do $IC_{50}$ da fração <3 kDa, uma vez que por trabalhos já descritos na bibliografia (Tavares *et al.*, 2011b), se verificou que a fração total do hidrolisado de concentrado de proteínas do soro (CPSH) apresenta valores mais elevados do índice $IC_{50}$ do que a fração <3 kDa, logo necessita de uma concentração mais alta de substância inibitória para inibir 50% da atividade da enzima. Este fato seria de esperar, uma vez que os péptidos biologicamente ativos têm entre 3 a 20 aminoácidos (Pihlanto-Leppälä, 2001) e a maioria dos péptidos com atividade inibidora da ECA descritos até ao momento, são de pequeno tamanho, estando comprovada a absorção de di- e tri- péptidos em quantidades suficientes para exercer efeitos *in vivo* (Amidon e Lee, 1994).

Deste modo, através da análise da Tabela 11 para o CPSH <3 kDa (CPep) verifica-se que de uma forma geral há um aumento da atividade inibidora de ECA relacionada com o aumento da relação E/S e/ou tempo de reação. Contudo para concentrações de enzima mais elevadas ou para tempos mais avançados de hidrólise tende a ocorrer uma similaridade grande entre os valores de $IC_{50}$ obtidos para as frações <3 kDa.

A maior atividade inibidora da ECA foi observada para as 7 h de hidrólise, apresentando um valor de 21,9 ± 2,5 μg/mL, uma vez que, como mencionado na Secção 1.6.1, valores de $IC_{50}$ baixos significam que uma pequena concentração de substância inibidora é necessária para produzir a inibição da enzima, sendo assim, a substância em causa apresenta uma potente atividade inibidora. Estes resultados para a atividade inibidora da ECA são bastante satisfatórios, uma vez que Otte *et al.* (2007) por exemplo relataram valores de $IC_{50}$ de 382 e 477 μg/mL para a β-caseína (CN) e CMP respetivamente, após a hidrólise por termolisina e os inibidores da ECA mais eficientes foram obtidos a partir de IPS e α-La com valores de $IC_{50}$ de 83 e 45 μg/mL, respetivamente pelos mesmos autores, no entanto esta atividade demonstra-se inferior à observada neste estudo.

Tendo em vista a determinação das condições ótimas de hidrólise para o GH e para a atividade inibidora da ECA, os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística, tendo sido para isso aplicada uma RLM de forma a estimar os parâmetros de cada variável resposta para o modelo proposto.

Na Figura 9 estão ilustrados os diagramas de Pareto padronizados para as 2 variáveis resposta estudadas, mostrando a importância e a significância estatística para os diferentes termos no modelo. Os termos são apresentados por ordem decrescente numa escala de valores absolutos. A linha vertical nos gráficos mostra, a significância do efeito num intervalo de confiança de 90%. Os efeitos (+) e (-) das variáveis resposta estão indicadas pelas diferentes cores das barras. A Figura 9 mostra ainda os gráficos de superfície de

resposta para 2 variáveis resposta, em função do tempo de reação e da relação E/S. Sendo usados para prever respostas futuras e para otimizar respostas.

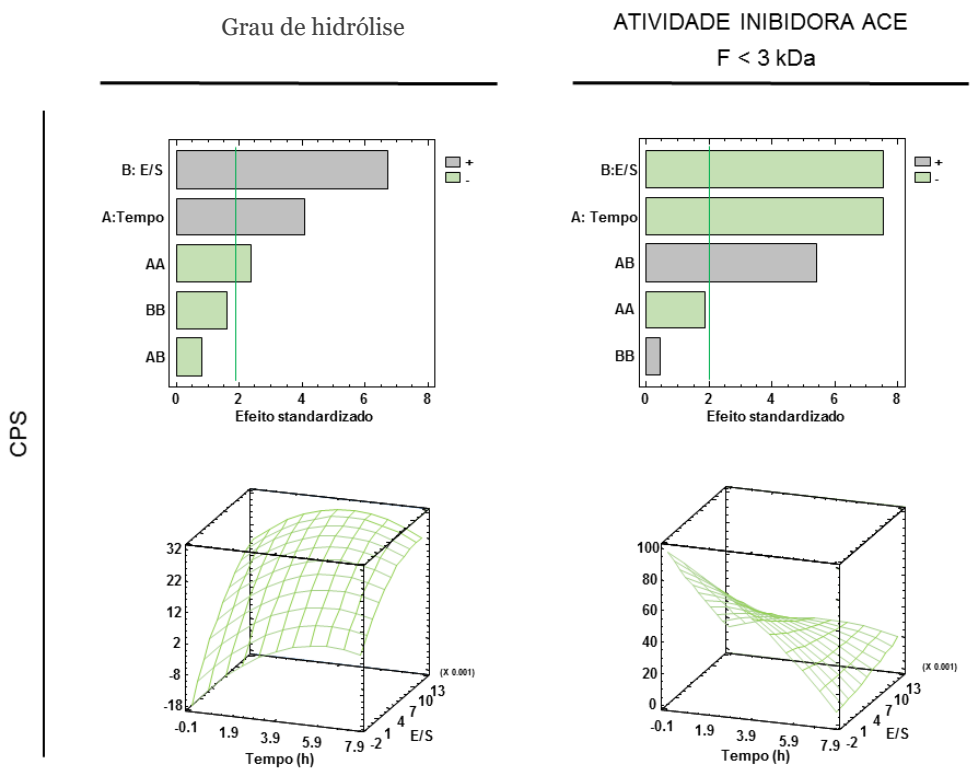



**Figura 12 –** Gráficos de pareto padronizados apresentando o efeito de cada termo no modelo dividido pelo erro standard para 2 das 2 variáveis resposta e superfícies de resposta obtidas mediante o modelo calculado (apresentadas na Tabela 11) que dependem da relação enzima/substrato e o tempo de reação.

Pela análise dos gráficos de superfície de resposta pode-se verificar que o GH apresenta um aumento na atividade relacionado o aumento do tempo de hidrólise e/ou da relação E/S. No entanto, quando analisamos a variável de resposta atividade inibidora da ECA, verifica-se o aparecimento de uma curva sigmoidal, onde há um máximo de tempo de reação e/ou de relação E/S e após atingir esse máximo, diminui. Tal já tinha sido mencionado na Secção 3.2.1, através da análise da Tabela 11.

Os resultados analisados por RLM incluindo uma série de resultados estatísticos relevantes encontram-se na Tabela 18.

**Tabela 18 –** Coeficientes de regressão estimados para os termos do modelo e valores estatísticos para avaliar o ajuste, usando regressão linear múltipla (RLM).

| **Termos do modelo** | **CONCENTRADO DE PROTEINAS DO SORO** | |
|---|---|---|
| | **GH[a]** | **IECA[b] (<3 kDa)** |
| **Constante** | -9,643 | 84,30 |
| ***T*** | 6,991** | -5,224 |
| ***R*** | 3568** | -5768** |
| ***T x T*** | -0,5724 | -0,5555 |
| ***T x R*** | -130,5 | 795,8** |
| ***R x R*** | -107590 | 36698 |
| | | |
| **Estatística** | | |
| ***R²*** | 0,910 | 0,973 |
| **SEE** | 3,96 | 3,49 |
| **RSEE (%)** | 22,3 | 8,7 |

*T* – tempo de reação; *R* – razão enzima/substrato

$R^2$, coeficientes de determinação; SEE, erro padrão da estimativa (standard error of the estimate); RSEE, erro padrão relativo da estimativa - erro padrão de estimativa expressos como percentagem do valor médio de resposta

[a] – GH – grau de hidrólise obtido pelo método de TNBS, expresso em %

[b] – atividade inibidora de ECA (IECA) obtida pelo método de Sentandreu e Toldrá (2006) modificado ($IC_{50}$ expresso em μg/mL)

Pela análise da Tabela 18, verifica-se que o coeficiente de determinação ($R^2$) para o grau de hidrólise é de 0,91 e de 0,97 para a atividade inibidora de ECA. Deste modo, o modelo mostra-se estatisticamente apropriado para descrever o GH e a atividade inibidora de ECA associada à hidrólise do CPS com a cardosina A. Para além disso, o erro padrão relativo da estimativa (RSEE), o qual providencia a medida do erro relativo do ajuste do modelo (usando os valores médios de cada resposta como referência) é inferior a 20 % para a atividade inibidora de ECA.

Os valores obtidos pelo programa de análise estatística para o tempo de reação e as relações E/S para cada variável resposta estão ilustrados na Tabela 19. Como já se tinha verificado pela análise dos gráficos das superfícies de resposta, os máximos estimados não são os máximos da experiência.

**Tabela 19 –** Condições ótimas (máximo grau de hidrólise, máxima atividade inibidora de ECA (fração <3 kDa), determinada por programa estatístico (usando o modelo ajustado da Tabela 11).

| | **Condições ótimas** | | **Previsto** |
|---|---|---|---|
| | Tempo (h) | Relação E/S (m/m) | Valor |
| **GH (%)** | 4,7 | 0,012 | 19,9 ± 4,2 |
| **Atividade inibidora da ACE - <3 kDa** | 7 | 0,002 | 22,3 ± 4,5 |

### 3.2.1.1. Validação do modelo

A atividade inibidora da ECA foi eleita a variável resposta mais importante na determinação das condições ótimas para a produção de hidrolisados de CPS, tendo sido definido 0,002 (m/m) para a razão E/S e 7 h para o tempo de reação.

Como tal, determinou-se o $IC_{50}$ das amostras obtidas dos CPSH com a cardosina A nas condições ótimas determinadas: CPSH, CPSH<3 kDa e CPSH>3 kDa. Os resultados estão representados na Figura 10.

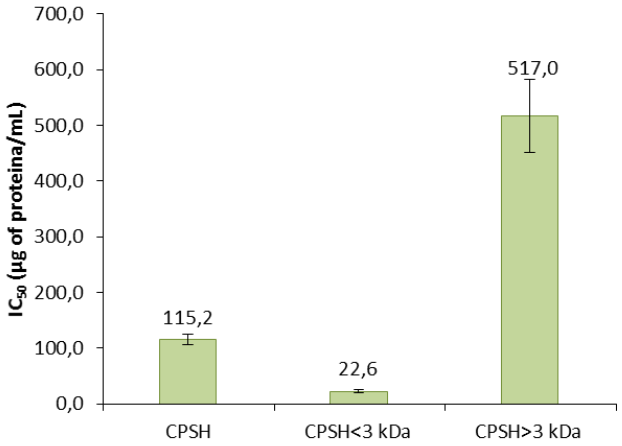



**Figura 13 –** Valores referentes aos índices de $IC_{50}$ das amostras dos hidrolisados do concentrado de proteínas do soro (CPSH) com cardosina A nas condições ótimas determinadas (fração total - CPSH, CPSH<3 kDa e CPSH>3 kDa). A atividade está expressa como $IC_{50}$ (concentração mínima necessária de proteína em µg/mL para inibir 50% da atividade da enzima).

A medição da atividade inibidora da ECA através do índice $IC_{50}$ permitiu concluir, que os valores estão concordantes com os que se tinham obtido para o hidrolisado do modelo estatístico, desta forma validando-o. A fração <3 kDa do CPSH obtido por ação da cardosina A apresenta uma atividade inibidora da ECA de 22,6 ± 3,1 µg/mL, comparável à atividade do extrato de cardo comercial a uma concentração 5 vezes superior (Tavares *et al.*, 2011a). O hidrolisado total (CPSH) trata-se de uma amostra mais complexa, na qual os péptidos com potencial poder inibidor se encontram menos concentrados, mesmo assim, os valores de $IC_{50}$ (115,2 ± 9,7 µg/mL) são interessantes para este tipo de fração quando comparados com produtos existentes no mercado, tornando-a muito interessante no que respeita a atividade inibidora da ECA. Relativamente à fração>3 kDa, os valores são extremamente elevados (517,0 ± 66,2 µg/mL), o que corrobora com o que tem vindo a ser referido, de que os péptidos de menor peso molecular são os responsáveis pela atividade

(FitzGerald *et al.*, 2004; Tavares e Malcata, 2013). Sendo assim obteve-se um concentrado peptídico (CPep ou CPSH<3 kDa) de alto valor funcional. Contudo, a nível industrial estas diferenças podem não ser consideradas significativas, dado que a obtenção da fração do CPSH<3 kDa é um processo demorado, além do custo associado à ultrafiltração membranar. Porém, para melhor entender a sua atividade em comparação com CPSH devem ser realizados estudos *in vivo*. Como já foi referido anteriormente, os estudos com hidrolisados proteicos de origem láctea apontam para valores de $IC_{50}$ entre os 50 - 500 μg/mL sendo por isso os valores obtidos neste trabalho bastante relevantes. Para além disto, os resultados são notáveis quando comparados com outras pesquisas que abrangem hidrolisados provenientes de variadíssimas fontes. É o caso de pesquisas sobre hidrolisados de colagénio de galinha que exibiram um $IC_{50}$ de 260,0 μg/mL (Saiga *et al.*, 2008); ou até mesmo em produtos existentes no mercado, como EE90FX (hidrolisados de ovos brancos), CE90STL (hidrolisados de caseína), SE50BT (hidrolisados de soja) e WGE80GPN (hidrolisados de glúten), que apresentam valores de $IC_{50}$ entre 373 e 782 μg/mL (Murakami *et al.*, 2004). Outros estudos, demonstraram que o produto Calpis (hidrolisados de leite) apresenta um $IC_{50}$ de 266 μg/mL (Shou Tsai, 2008), o Biozate® (hidrolisados de soro de leite) de 450 μg/mL e a bebida de soja apresenta valores de $IC_{50}$ de 80-360 μg/mL (Nakamura *et al.*, 1995). A discrepância nos valores de $Ic_{50}$ podem em parte ser explicados pelo tipo de péptidos formados durante a hidrólise, uma vez que como mencionado na Secção 1.6.1, péptidos com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos nas suas posições C-terminal, tendem a ser potentes inibidores da ECA.

Embora, estudos já efetuados façam referência a comparações do desempenho de péptidos com o captopril (fármaco padrão de inibição da ECA), é importante referir que este estudo consistiu apenas na otimização da hidrólise através da cardosina A, em vez de uma caracterização de péptidos puros, os quais mereciam uma comparação com o principio ativo

## 3.3. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade

Muitos estudos têm sido realizados na produção e isolamento de péptidos inibidores da ECA a partir de diferentes fontes alimentares, inclusive a partir do soro (Yamamoto *et al.*,2003: Tavares *et al.*, 2011; Théolier *et al.*, 2013; Lacroix et al., 2016). Contudo, é necessário que estes péptidos estejam biodisponíveis para garantir que exercem a sua bioatividade. Deste modo, tornou-se pertinente o seu estudo, para tal a atividade inibidora

da ECA foi determinada para o CPS e CPep, antes e após digestão e na fração apical e basolateral das células Caco-2. Os resultados encontram-se na Figura 11.

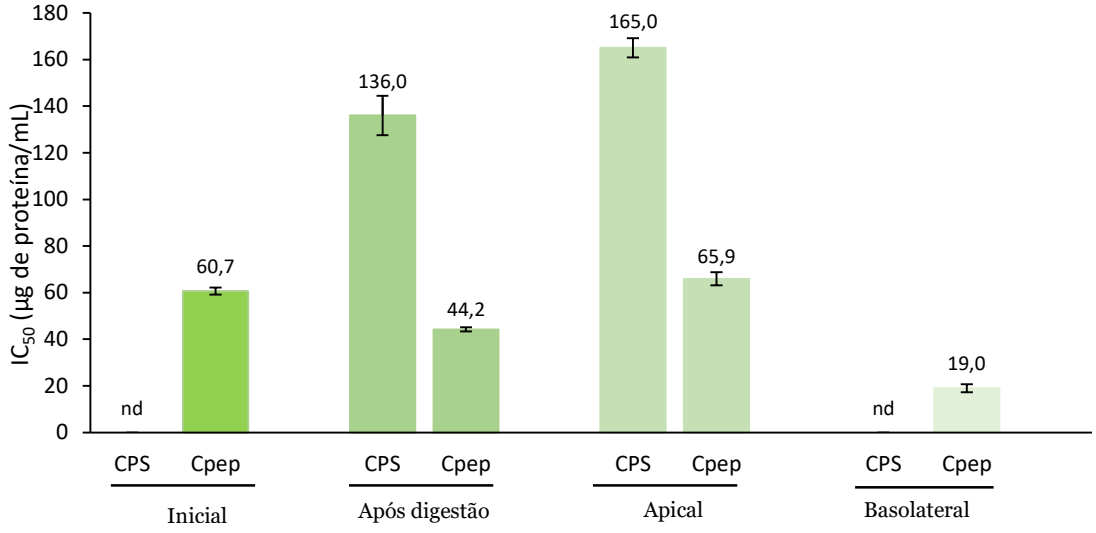



**Figura 14 –** Valores referentes aos índices de $IC_{50}$ do concentrado de proteínas do soro (CPS) e Concentrado Peptídico (CPep) iniciais, após simulação da digestão e compartimento apical e basolateral das células Caco-2. A atividade está expressa como $IC_{50}$ (concentração mínima necessária de proteína em µg/mL para inibir 50% da atividade da enzima).

Relativamente à bioacessibilidade, os resultados mostram que houve uma melhoria na atividade inibidora da ECA para o CPS e CPep quando comparada com os valores iniciais ($p$<0,001), no entanto, o tratamento de hidrólise do CPS para a obtenção do CPep, continua a ser benéfico, uma vez que mesmo sofrendo hidrólise pelas enzimas digestivas, a atividade inibidora da ECA do CPS é cerca de 33% da do CPep.

Nos estudos de absorção celular, verificou-se que mesmo apresentando uma melhoria na atividade após digestão o CPS não apresenta qualquer atividade no compartimento basolateral, ao contrário do CPep. No caso do CPep, verifica-se um aumento de atividade no compartimento basolateral, o que pode ser justificado, pela passagem dos péptidos mais pequenos, com atividade. Isto porque, como referido na Secção 1.7, a estrutura e a bioatividade dos péptidos de cadeia curta são mais facilmente preservados através da passagem gastrointestinal do que os de cadeia longa e sequências contendo resíduo(s) de Pro são geralmente mais resistentes à degradação por enzimas digestivas. Assim, através de estudos de bioacessibilidade/disponibilidade, verificou-se que submetendo o CPep a simulação digestiva seguido de absorção celular, o conteúdo do compartimento basolateral, apresenta atividade inibidora de ECA.

Embora se pense que os péptidos são metabolizados rapidamente nos seus aminoácidos constituintes, estudos realizados demonstraram que vários péptidos são

resistentes a esses processos fisiológicos e podem atingir a circulação. É o caso dos tri-péptidos curtos - IPP e VPP (Foltz *et al.*, 2008; Ohsawa *et al*, 2008) e de péptidos mais longos ricos em Pro, tal como, LHLPLP. Este último péptido resistiu a uma simulação da digestão gastrointestinal, mas foi hidrolisado para uma forma ativa mais curta, HLPLP, por peptidases celulares antes de ser transportado através do epitélio intestinal (Quirós *et al.*, 2008; Quirós *et al.*, 2009). Esta forma mais curta também foi detetada no plasma humano após administração por via oral o que demonstra a absorção intestinal do pentapéptido em seres humanos (van Platerink *et al.*, 2006).

Contudo, é difícil estabelecer uma relação direta entre a atividade inibidora da ECA *in vitro* e uma atividade anti-hipertensiva *in vivo,* dado que certos fatores extrínsecos (Capítulo 1, Secção 1.7) podem afetar absorção de nutrientes (Sandberg, 2005; Etcheverry *et al.*, 2012). Deste modo, ensaios *in vivo* devem ser realizados para suplementar este estudo.

Para além disto, tendo em vista uma aplicação a nível industrial, devem ser realizados estudos complementares de forma a compreender as interações entre as matrizes alimentares e os péptidos bioativos, uma vez que podem afetar a estrutura e bioatividade, podendo afetar a sua biodisponibilidade. Deste modo, a estabilidade de péptidos anti-hipertensivos incorporados em alimentos deve ser avaliada caso a caso.

# Capítulo 4 – Conclusões

Este trabalho teve como principal objetivo a produção de um CPep com atividade inibidora da ECA, obtido através da hidrólise de CPS por extrato de cardosina purificado, tendo em vista a sua aplicação na indústria alimentar.

As cardosinas têm sido objeto de estudo, nomeadamente no que se refere à produção de queijos tradicionais e à sua capacidade em gerar péptidos com atividades biológicas, apresentando, desta forma um papel importante na indústria de lacticínios.

Partindo de um extrato aquoso de *C. cardunculus*, estudou-se a estabilidade das enzimas presentes relativamente ao teor de sais minerais e ao processo de liofilização, tendo-se concluído que estes não afetam o desempenho das proteases presentes no extrato aquoso. Desta forma, partindo do extrato comercial *C. Cardunculus*, numa primeira fase foram estudados métodos alternativos aos descritos na bibliografia para extração e purificação das cardosinas visando o seu maior rendimento. Verificou-se que a ultrafiltração membranar seguida da cromatografia líquida através de coluna de troca iónica é o procedimento mais rentável, uma vez que o processo de ultrafiltração é menos moroso e que as frações obtidas por este método, não apresentam diferenças ao nível das atividades específicas (8,17 ± 0,30 e 0,78 ± 0,06 para atividade coagulante e proteolítica respetivamente) relativamente às obtidas pelo método tradicional, validando assim o método.

As condições ótimas de hidrólise encontradas para a obtenção do CPep foram 0,002 (m/m) para a razão enzima/substrato e 7 h para o tempo de reação. Os hidrolisados obtidos exibiram uma atividade inibidora da ECA caracterizada por um valor de $IC_{50}$ de 22,6 ± 3,1 µg/mL para a fração <3 kDa do CPSH; 115,2 ± 9,7 µg/mL para o CPSH e 517,0 ± 66,2 µg/mL para fração> 3 kDa do CPSH. Estes resultados demonstraram-se relevantes quando comparados com outros hidrolisados proteicos de origem láctea e bastante notáveis quando comprados com hidrolisados proteicos provenientes de outras fontes alimentares. Contudo, para que estes péptidos exerçam a sua bioatividade é necessário que estejam biodisponíveis. Como tal, tornou-se essencial o estudo da bioacessibilidade/biodisponibilidade, o qual permitiu concluir que o CPep quando submetido a simulação digestiva seguida de absorção celular apresenta atividade inibidora de ECA, caracterizada por um valor de $IC_{50}$ de 44,2 ± 0,9 µg/mL no "Após digestão", 65,9 ± 2,8 µg/mL no compartimento "Apical" e 19,0 ± 1,7 µg/mL no compartimento "Basolateral".

Em conclusão, demonstrou-se que o subproduto soro de queijo pode ser considerado um coproduto de valor acrescentado e uma mais-valia para a indústria alimentar uma vez que as suas proteínas e péptidos apresentam um elevado valor biológico e funcional, podendo ser aplicado em alguns alimentos funcionais.

# Capítulo 5 – Perspetivas futuras

Estudos relacionados com péptidos bioativos provenientes de fontes alimentares tornam-se vantajosos para os consumidores que estão cada vez mais conscientes da importância da alimentação na saúde e bem-estar. Existindo assim, cada vez mais na sociedade moderna uma procura por alimentos mais apelativos, seguros, saudáveis e se possível de alto valor acrescentado. Este estudo foi importante, uma vez que o CPep exibiu uma potente atividade inibidora da ECA. No entanto, esta é apenas uma das fases de trabalho, existindo muitas oportunidades de estudo dado que apesar dos péptidos bioativos poderem auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão, é necessário uma caracterização mais profunda dos péptidos constituintes e mecanismos de ação. Logo, deverão ser realizados estudos relacionados com a identificação, isolamento e caracterização dos péptidos presentes no hidrolisado de forma a elucidar quais são os responsáveis pela atividade inibidora da ECA. A fim de otimizar a libertação de péptidos, estudos de imobilização de enzimas também deverão ser levados a cabo e tendo em vista o estudo do rendimento enzimático, para além da razão E/S e do tempo de reação, outros fatores devem ser otimizados.

Trabalhos futuros deverão incluir a realização de ensaios *in vivo* (ratos) para concluir se estes péptidos promissores exercem atividade anti-hipertensiva *in vivo*, pois embora os estudos *in vitro* sejam úteis em fases de rastreio, não são suficientes para garantir a eficácia e segurança dos péptidos.

Tendo em vista uma aplicação a nível industrial, os péptidos deverão ser testados em sistemas alimentares reais, sendo para tal necessário proceder a uma avaliação do seu comportamento reológico e sensorial, para que sejam devidamente aceites pelos consumidores. Para além disto, seria importante que o CPep produzido fosse validado relativamente à citotoxicidade para uma eventual incorporação em alimentos. A microencapsulação será ainda uma solução vantajosa a aplicar para evitar a degradação dos péptidos bioativos. Num passo seguinte, seria interessante entender se os péptidos bioativos quando incorporados em alimentos apresentam uma boa estabilidade através da sua passagem no sistema gástrico e subsequente absorção no cólon e biodisponibilidade na corrente sanguínea. Para finalizar, é necessário a realização de ensaios clínicos com humanos voluntários para validar a função fisiológica dos péptidos bioativos.

# Capítulo 6 – Bibliografia

Abbood, A., Smadja, C., Herrenknecht, C., Alahmad, Y.,Tchapla, A., and Taverna, M. (2009). Retention mechanism of peptides on a stationary phase embedded with a quaternary ammonium group: a liquid cromatography study. *Journal chromatography A*, 1216, 3244-3251.

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., and Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science, 81,* 3131-3138.

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolyzates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27*, 1256-1262.

Akpinar-Bayizit, A., Ozcan, T., and Yilmaz-Ersan, L. (2009). Membrane processes in whey production, *Mljekarstvo, 59*, 282-288.

Alais, C. (1984). Ed. Science du lait: principes des techniques laitières 4. Paris: SEPAIC.

Alfa Laval/Tetra Pak (1995). Dairy processing handbook. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.

Almeida, K. E., Bonassi, I. A., and Roça, R. O. (2000). Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura lática. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, 55, 315, 7-13.

Almeida, K., Bonassi, I., and Roça, R. (2001). Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 187-192.

Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., and Teixeira, J. A. (2015). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus. *Food Chemistry*, 198, 54 – 61.

Amado, I. R.,Vázquez, J.A., González, P., Esteban-Fernández, D., Carrera, M., and Piñeiro, C. (2014). Identification of the Major ACE-Inhibitory Peptides Produced by Enzymatic Hydrolysis of a Protein Concentrate from Cuttlefish Wastewater. *Marine drugs*, 12, 1390-1405.

Amidon, G. L., and Lee, H. D. (1994). Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu.* Pharmacology and Toxicology*, 34,* 321-341.

Andrews, A.T., and Alichanidis, E. (1983). Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research,* 50, 275-290.

Ariyanti, S., Man, Z., and Azmi, B.M. (2014). Improvement of hydrophobicity of urea modified tapioca starch film with lignin for slow release fertilizer. *Advanced Materials Research*, 626, 350 - 354.

Ashar, M. N., and Chang, R. (2004). Antihypertensive peptides purified from milks fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Milchwissenschaft, 59,* 14-17.

Athira, S., Mann, B., Saini, P., Sharma, R., Kumar, R., and Singh, A.K. (2014). Production and characterisation of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2908-15.

Augustin, M.A., Sanguansri, P., Williams, R., and Andrews, H. (2012). High shear treatment of concentrates and drying conditions influence the solubility of milk protein concentrate powders. *Journal of Dairy Research*, 79, 459 – 468.

Badger, T. M., Ronis, M.J.J., and Hakkak, R. (2001). Developmental effects and health aspects of soy protein isolate, casein and whey in male and female rats. *International Journal of Toxicology*, 20, 165-174.

Balagtas, J. V., Hutchinson, F. M., Krochta, J. M., and Sumner, D. A. (2003). Anticipating market effects of new uses for whey and evaluating returns to research and development. *Journal of Dairy Science, 86,* 1662-1672.

Baldasso, C., Barros, T.C., and Tessaro, I.C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278, 381 – 386.

Barros, R. M., and Malcata, F. X. (2004). A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry, 88,* 351-359.

Barros, R. M., Ferreira, C. A., Silva, S. V., and Malcata, F. X. (2001). Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enzyme Microb. Technol. 29,* 541-547.

Becker, L. V. (2009). Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Biasutti, E. A. R., Afonso, W. O., Lopes junior, C.O., Coelho, J. V., Silva, V. D. M., Silvestre, M. P. C. (2008. Ação da pancreatina na Obtenção de hidrolisados protéicos de Soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. *Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São paulo, 44, 1, 51-60.

Boots, J.W., and Floris, R. (2006). Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *International Dairy Journal*, 16, 1272-1276.

Bouhallab, S., Favrot, C., and Maubois, J.L. (1993). Growth-promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Le Lait, 73, 73-77.

Bounous, G. (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research, 20,* 4785-4792.

Brew, K. (2011). α-Lactalbumin, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Vol. 3). *Academic Press*, London, 780 – 786.

Brody, E.P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84, S39 - S46.

Bruck, W.M., Graverholt, G., and Gibson, G.R. (2003). A two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α-lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria challenged with enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* serotype *Typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 44-53.

Chalmers, J. (2000). Blood pressure burden: vascular changes and cerebrovascular complications. *Journal of Hypertension*. *18*, S1-S2.

Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., and Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β-lactoglobulin and α-lactalbumin - technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16, 1229-1240.

Chavan, R.S., Shraddha, R.C., Kumar, A., and Nalawade, T. (2015). Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. *Food Processing & Technology*, 6, 215-711.

Chen, C., Chi, Y.J. (2012). Antioxidant, ace inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 36, 383 – 94.

Chen, G-W., Tsai, J-S., and Pan, B. S. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal, 17,* 641-647.

Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C. *et al.* (2003). The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*, *289*, 2560-2571.

Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 1-12.

Christaki, E., Bonos, E., Florou-Paneri, P.C. (2012). Nutritional and functional properties of *cynara* crops (Globe Artichoke and Cardoon) and their potential applications: A Review. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2, 64-67.

Clare, D. A., Catignani, G. L., and Swaisgood, H. E. (2003). Biodefense properties of milk, the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design, 9,* 1239-1255.

Comino, E., Riggio, V., and Rosso, M. (2012). Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. *Bioresource Technology*, 114, 46 - 53.

Contreras, M.D.M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J., Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. Food Science and Technology, 44, 9-15.

Corrêa. A.P.F., Daroit, D.J.,Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J., Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61,48 – 55.

Creamer, L., Loveday, S., and Sawyer, L. (2011). β-Lactoglobulin, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Vol. 3). *Academic Press*, London, 787 – 794.

Curtis, J. M., Dennis, D., Waddell, D. S., MacGillivray, T. and Ewart, H. S. (2002). Determination of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide Leu-Lys-Pro-Asn-Met (LKPNM) in bonito muscle hydrolysates by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,* 3919-3925.

Dabarera, M.C., Athiththan, L.V., and Perera, R.P. (2015). Antihypertensive peptides from curd. *International Journal of Research in Ayurveda, 36,* 214 - 219.

Dartey, C., Leveille, G., and Sox, T.E. (2003). Compositions for appetite control and related methods. *US Patent* 0,059,495 A1.

de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science,* 81, 597-608.

Didelot, S., Bordenave-Juchereau, S., Rosenfeld, E., Fruitier-Arnaudin, I., Piot, J. M. and Sannier, F. (2006). Preparation of angiotensin-I-converting enzyme innibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *International Dairy Journal, 16,* 976-983.

Eckert, E., Zambrowicz, A., Pokora, M., Polanowski, A., Chrzanowska, J., Szoltysik, M., *et al.* (2013).Biologically active peptides derived from egg proteins. *World`s Poultry Science Journal*,69, 375 – 86.

Etcheverry, P., Grusak, M.A., and Fleige, L.E. (2012). Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Physiology*, 3, 1-16.

Expósito, I.L., and Récio, I. (2006). Antibacterial activity of peptides and holding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1294-1305.

Farrell, H., Jimenez-Flores, R., Bleck, G., Brown, E., Butler, J., Creamer, L., Hicks, C., Hollar, C., Ng-Kwai-Hang, K., and Swaisgood, H. (2004). Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641 – 1674.

Farrell, H., Jimenez-Flores, R., Bleck, G., Brown, E., Butler, J., Creamer, L., Hicks, C., Hollar, C., Ng-Kwai-Hang, K., and Swaisgood, H. (2004). Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641 – 1674.

Fazão, N. (2001).Estudo de Mercado do Soro Lácteo em Portugal.Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios (ANIL), Portugal.

Fennema, O.R. (2000). Química de los alimentos. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1258.

Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Mota, M. V., Tavares, P., Pereira, A., Goncalves, M. P., Torres, D., Rocha, C., and Teixeira, J. A. (2007). Preparation of ingredients containing an

ACEinhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 17, 481 – 487.

FitzGerald, R. J., and Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology, 59,* 118-125.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., and Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition, 134,* 980-988.

Fox, P. F., and Mcsweeney, P. L. H. (1998). Milk Proteins. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London, UK: Blackie Academic and Professional, 5, 1-22.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H. (2000). Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg, Maryland, USA: *Aspen Publishers*, 587.

Fujita, H., Yokoyama, K., and Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science, 65*, 564-569.

Gall, H., Kalveram, C., Sick, H., and Sterry, W. (1996). Allergy to the heat-labile proteins α-lactalbumin and β-lactoglobulin in mare's milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunollogy*, 97, 1304-1307.

Ganjam, L.S., Thornton, W.H., Marshall, R.T., and MacDonald, R.S. (1997). Antiproliferative effects of yoghurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 80, 2325-2329.

Gill, H. S., Rutherford, K. J., and Cross, M. L. (2000). Bovine milk: a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In: Buttriss J, Saltmarsh M. (ed.) 55 Functional foods II – claims and evidence. Cambridge, UK: *Royal Society of Chemistry Press*, 2, 82-90.

Giraldo-Zuniga, A. D., Arévalo-Pinedo, A., Rodrigues, R. M., Lima, C. S. S., and Feitosa, A. C. (2002). Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 57, 325, 3546.

Gobetti, M., Minervini, F., and Grizzello, C. (2004). Angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology, 57,* 173-188.

Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal, 14,* 1075-1080.

Groleau, P.E., Morin, P., Gauthier, S.F., and Pouliot, Y. (2003). Effect of physicochemical conditions on peptide-peptide interactions in a tryptic hydrolysate of β-lactoglobulin and identification of aggregating peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4370-4375.

Hakansson, A., Svensson, M., Mossberg, A.K., Sabharwal, H., Linse, S., Lazou, I., Lönnerdal, B., and Svanborg, C. (2000). A folding variant of α-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 35, 589-600.

Hakkak, R., Korourian, S., Shelnutt, S.R., Lensing, S., Ronis, M.J.J., and Badger, T.M. (2000). Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced mammary tumours in female rats. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9, 113-117.

Hall, W.L., Millward, D.J., Long, S.J., and Morgan, L.M. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89, 339-348.

Hartmann, R., and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology, 18,* 163-169. Udenigwe, C.C., and Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77, R11-R24.

Hartmann, R., and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology, 18,* 163-169.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 1504-1510.

Hernández-Ledesma, B., López-Expósito, I., Ramos, M., and Recio, I. (2006). Bioactive peptides from milk proteins. In: Pizzano, R. Ed. *Immunochemistry in Dairy Research*. Kerala, India: Trivandrum. 37-60.

Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., and Gómez-Ruiz, J. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101, 196 – 204.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos M. and Amigo L. (2002). Preparation of ovine and caprine beta-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine beta-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal, 12,* 805-812.

Huang, W.Y., Davidge, S.T., and Wu, J. (2013).Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,53,615 – 630.

Hutkins, R. (2006). Cheese, in: Hutkins, R. (Ed.), Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing, Oxford, 145 – 206.

Hydamaka, A.W., Wilbey, R. A., Lewis, M. J., and Kuo A.W. (2001). Manufactore of heat and acid coagulated cheese from ultrafiltered milk retentates, *Food Research International*, 34, 197-205.

Ijäs, H., Collin, M., Finckenberg, P., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H., and Nurminen, M. L. (2004). Antihypertensive opioid-like milk peptide α-lactorphin: lacks effect on behavioural tests in mice. *International Dairy Journal, 14,* 201-205.

Innocente, N., Corradini, C., Blecker, C., and Paquot, M. (1998). Emulsifying properties of the total fraction and the hydrophobic fraction of bovine milk proteose-peptones. *International Dairy Journal, 8,* 981-985.

Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan. F., Yardi, V., and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121,178 – 84.

Jeewanthi, R. K., Lee, N. K., and Paik, H. D. (2015). Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry**.** *Korean Society for Food Science of Animal Recources*, 35, 350-359.

Jelen, P. (1992). Whey cheeses and beverages. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., *Elsevier Applied Science*, 5, 157-190.

Jelen, P. (2003). Whey processing. In: H. Roginski, J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.) Encylcopediaof dairy sciences. London: Academic Press, 2739 – 2751.

Jelen, P., (2011). Utilization and Products, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Vol. 4). Academic Press, London, 731 – 737.

Jenkins, T.C., and McGuiret, M. A. (2006). Major advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science*, 89, 1302-1310.

Kale, R.N., Bajaj, A.N. (2010). Ultraviolet Spectrophotometric Method for Determination of Gelatin Crosslinking in the Presence of Amino Groups. *Journal of Young Pharmacists*, 2, 90-94.

Kitts, D.D., and Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.

Kohmura, M., Nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E., and Ariyoshi, Y. (1989). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human α-casein. *Agricultural and Biological Chemistry, 53,* 2107-2114.

Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., and Varila, P. (2005). Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules*, 6, 561-565.

Komatsu, T. R., Buriti, F. C. A. B., and Saad, S. M. I. (2008). Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutic al Sciences,* 44, 3, 329 - 347.

Kontopidis, G., Holt, C., and Sawyer, L. (2004). Beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785 – 796.

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods,* 1, 177-187.

Korhonen, H., and Marnila, P. (2011). Lactoferrin, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Vol. 3). Academic Press, London, 801 – 806.Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2003).Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.

Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.

Korhonen, H., Marnila, P., and Gill, H.S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition,* 84, S75-S80.

Kuhn, N.J., and White, A. (2009). The topography of lactose synthesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14, 213 – 220.

Kunitz, M. (1947). Crystalline soyabean trypsin inhibitor II. *The Journal of General Physiology*, 30, 291 - 310.

Kussendrager, K.D., and van Hooijdonk, A.C.M. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition,* 84, 19-25

Lacroix, I.M.E., Meng, G., Cheung, I.W.Y., Li-Chan, E.C.Y. (2016). Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities?. *Journal of Functional Foods*, 21, 87 – 96.

Laursen, I., Briand, P., and Lykkesfeldt, A. E. (1990). Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Research, 10,* 343-351.

Ledoux, N., Mahé, S., Dubarry, M., Bourras, M., Benamouzig, R., Tomé, D. (1999). Intraluminal immunoreactive caseinomacrope ptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung*, 43,196-200.

Lee, N., Cheng, J., Enomoto, T., Nakano, Y. (2006). One peptide derived from hen ovotransferrin as pro-drug to inhibit angiotensin converting enzyme. *Journal of Food Drug Anal*, 14, 31 – 35.

Lemes, A.C., Sala, L., Ores, J.C., Braga, A.R.C., Egea, M.B., and Fernandes, K.F. (2016). A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste.*International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2-24.

Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., Sforza, S., and Segato, S. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevo cheese. *International Dairy Journal*, 20, 11-17.

Loimaranta, V., Laine, M., Söderling, E., Vasara, E., Rokka, S., Marnila, P., Korhonen, H., Tossavainen, O., and Tenovuo, J. (1999). Effects of bovine immune- and non-immune whey preparations on the composition and pH response of human dental plaque. *European Journal of Oral Science*, 107, 244-250.

López-Fandiño, R., Otte, J., and van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, *16*, 1277-1293.

Lucema, M., Alvarez, S., and Menéndez, C. (2006). Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates production of milk derivatives as a base for infant formulas. *Separation and Purification Technology*, 52, 310-316.

Madureira, A., Pereira, C., Gomes, A., Pintado, M., and Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*. 40, 1197-1210.

Madureira, A., Tavares, T., Gomes, A., Pintado, M., and Malcata F. (2010). Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 93, 437-455.

Maes, W., van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M.,Ketelslegers, J. M., Schrezenmeier, J., van Oostveldt, P., & Huyghebaert, A. (2004). Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118, 105 – 109.

Magalhães, K., Pereira, M., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J., Silva, J., and Schwan, R. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, 101, 8843-8850.

Manso, M. A. and López-Fandiño, R. (2003). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine kappa-casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Protection, 66,* 1686-1692.

Manso, M. A. and López-Fandiño, R. (2004). κ-Casein macropeptides from cheese whey, physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International, 20,* 329-355.

Manso, M. A., Escudero, C., Alijo, M., and López-Fandiño, R. (2002). Platelet aggregation inhibitory activity of bovine, ovine and caprine κ -casein macropeptides and their tryptic hydrolyzates. *Journal of Food Protection, 65,* 1992-1996.

Marks, N.E., Grandison, A.S., and Lewis, M.J. (2001). Challengetesting of the lactoperoxidase system in pasteurised milk. *Journal of Applied. Microbiology,* 91, 735-741.

Markus, C.R., Olivier, B., and Haan, E. (2002). Whey protein rich in α-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 1051-1056.

McIntosh, G.H., Royle, P.J., le Leu, R.K., Regester, G.O., Johnson, M.A., Grinsted, R.L., Kenward, R.S., Smithers, G.W. (1998). Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal*, 8, 425-434.

Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry, 12,* 1905-1919.

Meisel, H., and FitzGerald, R.J. (2000): Opioid peptides encrypted in milk proteins. *Journal of Nutrition*, 84, 27-31.

Meisel, H., Schlimme, E. (1996). Bioactive peptides derived from milk proteins: ingredients for functional foods? *Kieler Milchwirtschaftliche und Forschungsberichte*, 48, 343-357.

Mellander, O. (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Society of Medical Upsal*, 55, 247-255.

Melo, A., Faria, M.A., Pinto, E., Mansilha, C., Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2016). *In vitro* bioacessibility and transport across Caco-2 monolayers of haloacetic acids in drinking water. *Chemosphere*,161, 19-26.

Mezzaroba, L.F.H., Carvalho, J.E., Ponezi, A.N., Antônio, M.A., Monteiro, K.M., Possenti, A., and Sgarbieri, V.C. (2006). Antiulcerative properties of bovine α-lactalbumin. *International Dairy Journal*, 16, 1005-1012.

Micke, P., Beeh, K.M., and Buhl, R. (2002). Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma GSH levels of HIV-infected patients. *European Journal of Nutrition*, 41, 12-18.

Micke, P., Beeh, K.M., Schlaak, J.F., and Buhl, R. (2001). Oral supplementation with whey proteins increases plasma GSH levels of HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 31, 171-178.

Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I., and Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry. 112*, 211-214.

Miller, G. D., Jarvis, J. K., and Mcbeon, L. D. (2000). Handbook of: Dairy Foods and Nutrition. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.

Miller, G. D., Jarvis, J. K., and Mcbeon, L. D. (2000). Handbook of: Dairy Foods and Nutrition. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.

Minekus, M.,Alminger, M., Alvito, P.,Ballance, S., Bohn,T., Bourlieu,C.,Carrière, F. *et al.* (2014). *Food and Function*, 5, 1113.

Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology, 69,* 5297-5305.

Mitra, A.K., Mahalanabis, D., Unicomb, L., Eechels, R., and Tzipori, S. (1995). Hyperimmune cow colostra reduces diarrhoea due to rotavirus: a double-blind, controlled clinical trial. Acta Paediatrica, 84, 996-1001.

Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y., and Yamamoto, N. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled

study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*, 94, 84-91.

Möller, N. P., Scholz- Ahrens, K, E., Roos, N., and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171-182.

Montagne, P. M., Cuiliere, M. L., Mole, C. M., Bene, M. C., and Faure, G. C. (2000). Faure, Dynamics of the main immunologically and nutritionally available proteins of human milk during lactation. *Journal of Food Composition and Analysis, 13,* 127-137.

Montiel, R., Bravo, D., de Alba, M., Glaya, P., Medina, M. (2012). Combined effect of high pressure treatments and the lactoperoxidase system on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 16, 26-32.

Mullally, M. M., Meisel, H., and Fitzgerald, R. J. (1996). Synthetic peptides corresponding to α-lactalbumin and β-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 377,* 259-260.

Mulvihill, D.M., and Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation- a review. *Irish Journal of Food Science and Technology,* 11, 43-75.

Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., and Saito, T. (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science, 87,* 1967-1974.

Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., *et al.* (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science*, 87, 1967 – 74.

Murray, B.A., Walsh, D.J., FitzGerald, R.J. (2004). Modification of the furanacryloyl-L phenylalanylglycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59, 127 – 37.

Murray, C. J. L., Lopez, A. D. (1996). The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. *Global Burden of Disease and Injury Series, vol 1.* Cambridge: Harvard School of Public Health.

Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., and Kuwata, T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk blactoglobulin.*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 11-17.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from a sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777 – 83.

Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). An improved method for determining enantiomeric excess by (13) C-NMR in chiral liquid crystal media. *Food Chemistry Toxicology*, 22, 838 – 43.

OAA/FAO. (2014). FAOSTAT. Disponível em: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E. Acedido em: 23.9.14.

Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J., Valdez, L.M., Douglass, E., and DuPont, H.L. (1998). Prophylactic effect of bovine anti-*Cryptosporidium hyperimmune* colostra immunoglobulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*. *Clinical Infectious Diseases*, 26, 1324-1329.

Oliveira, D. F., Bravo, C. E. C., and Tonial, I.B. (2012). Whey of milk: a valuable product. *Revista Instituto de Laticinios Cândido Tostes*, 67, 64-71.

Ormrod, D.J., and Miller, T.E. (1991). The anti-inflammatory activity of a low molecular weight component derived from the milk of hyperimmunized cows. *Agents and Actions*, 32, 160-166

Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J. A., Rastall, R. A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H., and Jauregi, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from β-lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal, 19,* 69-76.

Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., and el-Shabrawy, S. A. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolyzates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal, 17,* 488-503.

Özen, A.E., Bibiloni, M.D.M., Pons, A., Tur, J.A. (2014). Consumption of functional foods in Europe; a systematic review. *Nutrición Hospitalaria*, 29, 470 – 480.

Ozen, A.E., Pons, A., Tur, J.A. (2012). Worldwide consumption of functional foods : a systematic review. *Nutrition Reviews*, 270, 472 – 81.

Pan, D., Luo, Y. K., and Tanokura, M. (2005). Antyhypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chemistry, 91,* 123-129.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., and Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, 1 – 14.

Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., and Bressler, D.C. (2015). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in etanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 99, 1 – 9.

Parodi, P.W. (1998). A role for milk protein in cancer prevention. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 37-47.

PATTARIN, R. *et al.* (2010). Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 30, 58-60.

Permyakov, E., and Berliner, L. (2000). Alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett*ers, 473, 269 - 274.

Pescuma, M., Hébert, E., Mozzi, F., and de Valdez, G. (2010). Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 73 – 81.

Pihlanto-Leppälä, A. P. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, *11*, 347-356.

Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., and Korhonen H. (2000). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory properties of whey proteins digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research, 67,* 53-64.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., and Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal, 8,* 325-331.

Polat, Z. (2009). Integrated approach to whey utilization through natural zeolite adsorption/ desorption and fermentation. PhD Thesis, Izmir University, Turkey.

Prates, J. A. M., and Mateus, C. M. R. P. (2002). Physiologically active components from animal food sources. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97 (541): 3-12.

Prazeres, A., Carvalho, F., and Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48 – 68.

Pripp, A. H., Sørensen, R., Stepaniak, L., and Sørhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT – Food Science and Technology, 36,* 677-683.

Quirós, A., Contreras, M.D.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.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A. *et al*. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal, 17*, 33-41.

Rai, A. K., Sanjukta, S., and Jeyaram, K. (2015). Production of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory (ACE-I) Peptides during Milk Fermentation and Their Role in Reducing Hypertension. *Food Science and Nutrition*, 2, 1549-7852.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., and Chilliard, Y. (2008).Composition of goat and sheep milk products: An update. Small Ruminant Research, 79, 57-72.

Rektor, A., and Vatai, G. (2004). Membrane filtration of Mozzarella whey. *Desalination*, *162,* 279-286.

Révillion, J.P., Brandelli, A., and Ayub M.A.Z. (2000). Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 20, 2.

Ribeiro-Santos, R., Souza, A.L.R., Trombete, F.M., Melo, N.R. (2015). Whey protein: use and application in the production of biodegradable packaging. *Revista Verde*, 5, 51-58.

Rosaneli, C. F., Bighetti, A. E., Antônio, M. A., Carvalho, J. E., and Sgarbieri, V. C. (2004). Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. *Journal of Medicinal Food, 7*, 309-314.

Rosolen, M.D., Gennari, A., Volpato, G., and Volken de Souza, C. F. (2015). Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial β-Galactosidases. *Enzyme Research, 2015,* 1-7.

Roufik, S., Gauthier, S., and Turgeon, S. (2007). Physicochemical characterization and *in vitro* digestibility of α-lactoglobulin/β-Lg f142-148 complexes. *International Dairy Journal*, 17, 471-480.

Rowlands, J.C., He, L., Hakkak, R., Ronis, M.J.J., and Badger, T.M. (2001). Soy and whey proteins down regulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *Journal of Nutrition*, 131, 3281-3287.

Rutherfurd, S.M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. Journal of AOAC International, 93, 5, 1515-1522

Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A., and Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal, 11,* 441-447.

Saboya, L. V., and Maubois, J. L. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Le Lait, 80,* 541-553.

Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., *et al.* (2008). Angiotensin I-Converting Enzyme Peptides Obtained from Chicken Collagen Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9586 – 9591.

Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., and Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science, 83,* 1434-1440.

Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., and Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.

Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M. del M., Carrón, R. *et al.* (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacological. Research, 63,* 398-404.

Sandberg, A.S. (2005).Methodsand options *in vitro* dialyzability; benefits andlimitations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75, 395 – 404.

Sarmento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C.S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debys, G.,*et al.* (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L. Planta*, 230,429 – 439.

Sarmento, A. C., Oliveira, C. S., Pires, E., Amado, F. *et al.* (2004). Reverse hydrolysis by cardosin A. Specificity considerations. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*, 28, 33-37.

Schlothauer, R. C., Schollum, L. M., Reid, J. R., Harvey, S. A., Carr, A., and Fanshawe, R. L. (2002). Improved bioactive whey protein hydrolyzate. Patent NZ01/00188 (WO 02/19837 A1): New Zealand.

Scholz-Ahrens, K.E., and Schrezenmeir, J. (2000). Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *British Journal of Nutrition*, 84, 147-153.

Seifu, E., Buys, E. M., and Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science and* Technology, 16,137- 154.

Sentandreu, M.Á., Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546 – 548.

Seo, Y. H, Sung, M., and Han, J.I. (2015). Lactulose production from cheese whey using recyclable catalyst ammonium carbonate. *Food Chemistry*, 197, 664-669.

Shakeel-ur-Rehman, and Farkye, N.Y. (2003). Lactoperoxidase. *In*:Roginski, R., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), Encyclopediaof Dairy Science. *Academic Press*, Amsterdam, 939-941.

Sharpe, S.J., Gamble, G.D., and Sharpe, D.N. (1994). Cholesterol-lowering and blood pressure effects of immune milk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, 929-934.

Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors, 21,* 43-47.

Silanikove, N., and Shapiro, F. (2012). Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions. In *Dietary Sugars: Chemistry, Analysis, Function and Effects, Food and Nutritional Components in Focus*; Victor, R.P., Ed.; The Royal Society of Chemistry:

Silanikove, N., Leitner, G., and Merin, U. (2015). The Interrelationships between Lactose Intolerance and the Modern Dairy Industry: Global Perspectives in Evolutional and Historical Backgrounds. *Nutrients*, 7, 7312-7331.

Silva, S. V., Almere, T., Malcata, F. X., and Anders, A. (2003). Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara candunculus* and chymosin on cow‘s skim milk. *International Dairy Journal, 13,* 559-564.

Silva, S. V., Almere, T., Malcata, F. X., and Anders, A. (2003). Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara candunculus* and chymosin on cow’s skim milk. *International Dairy Journal, 13,* 559-564.

Silva, S. V., and Malcata, F. X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara carduncul*us. *Food Chemistry*, 89, 1926.

Simpson, K.J., and Nicholas, K.R. (2002). The comparative biology of whey proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,* 7, 313-326.

Singh, A.K., Singh, N.,Sharma, S., Singh, S.B., Kaur, P., Bhushan, A., Srinivasan, A., and Singh, T.P. (2008). Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 376, 1060 - 1075.

Smithers, G. (2008). Whey and whey protein - From "gutter-to-gold". *International Dairy Journal*, 18, 695 – 704.

Smithers, G. W., Ballard, F. J., Copeland, A. D., Silva, K. J., Dionysius, D. A., Francis, G. L., Goddard, C., Grieve. P. A., Mcintosh, G. H., Mitchell, I. R., Pearce, R. J., and Regester, G. O. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science, 79,*1454-1459.

Sousa, M. J., Ardö, Y., and McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.

Spalatelu, C. (2012). Biotechnological valorization of whey. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 1-8.

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., FitzGerald, R.J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal,* 13, 6, 447 – 53.

Steijns, J.M., and van Hooijdonk, A.C.M. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition,* 84, S11-S17.

Svensson, M., Håkansson, A., Mossberg, A.-K., Linse, S., and Svanborg, C., (2000). Conversion of alpha lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4221-4226.

Tavares, T.G. (2011). Production and characterization of the biological activity of peptides obtained via hydrolysis from whey proteins by cardosins. Tese de doutoramento em Engenharia e Ciencias Tecnológicas – Bioquímica. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, 20- 21.

Tavares, T.G., Amorim, M., Gomes, D., Pintado, M.E., Pereira, C.D.,Malcata, F.X. (2012). Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. *Journal of Food Engineering*, 110,547 – 552.

Tavares, T.G., and Malcata, F.X. (2013). Whey Proteins as Source of Bioactive Peptides Against Hypertension. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*,10, 5772-52680.

Tavares, T.G., Contreras, M.M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P.J., Pintado, M.E., Recio, I., Malcata, F.X. (2011a). Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis, antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolyzates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, 21, 926-933.

Tavares, T.G., Monteiro, K.M., Possenti, A., Pintado, M.E., Carvalho, J.E., Malcata, F.X. (2011b). Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey protein brought about by proteases from *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, 21, 934-939.

Tavares, T.G., Sevilla, M.A., Montero, M.J., Carrón, R., Malcata, F.X. (2011c). Acute effects of whey peptides upon blood pressure of hypertensive rats, and relationship with their

angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 316 – 324

Tavares, T.G., Spindola, H., Longato, G., Pintado, M.E., Carvalho, J.E., Malcata, F.X. (2013). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of novel dietary protein hydrolysate produced from whey by proteases of *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, 32, 156-162.

Tecninvest. (2000). Estudo de mercado do soro lácteo em Portugal.Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios.

Thamer, K. G., and Penna, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,26, 3, 589-595.

Théolier, J., Hammami, H., Labelle, P., Fliss, I., Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5, 706 – 7 1 4.

Tolkach, A., and Kulozik, U. (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67, 13-20.

Tolkach, A., and Kulozik, U. (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67, 13-20.

Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., and Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 1473-1478.

Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., and Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from Phaseolus lunatus and Phaseolus vulgaris seeds. *Food Science and Technology*, 42, 1597-1604.

Tsai, J. S., Chen, T. J., Pan, B. S., Gong, S. D. *et al.* (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry. 106*, 552-558.

Tsutsumi, R., and Tsutsumi, Y.M. (2014). Peptides and proteins in whey and their benefits for human health. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1, 2381-8980.

Udenigwe, C.C., and Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77, R11-R24.

van Platerink, C. J., Janssen, H.G. M., Horsten, R., and Haverkamp, J. (2006). Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 830, 151 – 157.

Vandanjon, L., Johannsson, R., Derouiniot, M.,Bourseau, P., Jaouen, P. (2007). Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes. *Journal of Food Engineering*,83, 581 – 589.

Vardakou,M.,Mercuri,A.,Naylor,T.A.,Rizzo,D.,Butler,J.M.,Connolly,P.C.,Wickham,M.S.J.,and Faulks, R. M. (2011).Predictingthehuman *in vivo* performanceofdifferentoral capsule shelltypesusinganovel *in vitro* dynamicgastricmodel. *International Journal of Pharmaceutics,* 419, 192 – 199.

Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J., Lin, Y., Tang, J., and Pires, E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus L. European Journal of Biochemistry, 235,* 762-768.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51, 75–87.

Vermeirssen, V., Verstraete, W., and van Camp, J. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

Versantvoort, C. H., Oomen, A. G. E. V., Rompelberg, C. J. and Sips, A. J. (2005). Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 31-40.

Versantvoort, C.H., van de Kamp, E. and Rompelberg, C.J. (2004). Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. *Inspectorate for Health Protection*,13-23.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., and van Boekel, M. A. J. S. (2001). Ciencia de la Leche y Tecnologia de los Productos Lácteos. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, 752.

Walzem, R.L., Dillard, C.J., German, J.B. (2002). Whey components: millennia of evolution. *Food Science and Nutrition*, 42, 353-375.

Warme, P.K.F., Momany, A., Rumball, S.V., Tuttle, R.W., Scherag, H.A. (1974). Computation of structures of homologous proteins. α-Lactalbumin from lysozyme. *Biochemistry*, 13, 768-782.

Wolfson, L.M., and Sumner, S.S. (1993). Antibacterial activity ofthe lactoperoxidase system: a review. *Journal of Food Protection*, 56, 887-892.

Wu, S.Y., Pérez, M.D., Puyol, P., and Sawyer, L. (1999). β-Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 170-177.

Wynn, P., Morgan, A., and Sheehy, P. (2011). Minor Proteins, Bovine Serum Albumin, Vitamin-Binding Proteins, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Vol. 3). *Academic Press*, London, 795 – 800.

Yamamoto, N., Ejiri, M., and Mizuno, S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design, 9*, 1345-1355.

Yamauchi, R., Sonoda, S., Jinsmaa, Y., and Yoshikawa, M. (2003). Antinociception induced by β-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from β-lactoglobulin, is mediated by NT2 and D1 receptors. *Life Sciences*, 73, 1917-1923.

Yamauchi, R., Sonoda, S., Jinsmaa, Y., and Yoshikawa, M. (2003). Antinociception induced by β-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from β-lactoglobulin, is mediated by NT2 and D1 receptors. *Life Sciences*, 73, 1917-1923.

Zaman, M. A., Oparil, S., and Calhoun, D. A. (2002). Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1,* 621-636.

Zydney, A. L. (1998). Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *International Dairy Journal*, *8,* 243-250