

PÉPTIDOS BIOACTIVOS DAS PROTEÍNAS DO LEITE COM ACTIVIDADE REGULADORA DA TENSÃO ARTERIAL

Eça R^I, Ferreira IMPLVO^{II}

^I Aluna do Curso de Ciências Farmacêuticas; rosarinho_eca@portugalmail.pt

^{II} Professora auxiliar com agregação; isabel.ferreira@ff.up.pt

REQUIMTE – Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Anibal Cunha 164, 4050-047 Porto – Portugal

Resumo

Os péptidos bioactivos, podem existir naturalmente no alimento ou, o que é mais comum, estarem inactivos ou mesmo ausentes nas sequências de aminoácidos das proteínas nativas, e serem libertados ou activados, in vivo aquando da digestão proteolítica ou do processamento do alimento, por proteólise mediada por enzimas.

Os péptidos com bioactividade provenientes do leite têm revelado diversas funções quer in vivo quer in vitro, nomeadamente, reguladores do sistema nervoso (actividade opioide), aumento da resistência a doenças infecciosas (antimicrobianos e imunomoduladores), reguladores do sistema cardiovascular (antitrombóticos, antibipertensores e antioxidantes), assim como facilitar o transporte de minerais.

Neste trabalho de revisão deu-se ênfase à acção e modo de obtenção de péptidos com propriedades inibidoras da enzima conversora da angiotensina. Foi dada especial atenção, à hidrólise enzimática e à fermentação do leite, processos que permitem obter péptidos com esta actividade e deste modo, alcançar um efeito de regulação da pressão arterial.

Palavras chave:

Péptidos bioactivos; proteínas do leite; alimentos funcionais; inibidores da enzima conversora da angiotensina.

Abstract

Bioactive peptides can exist in food products or, which is more common, being latent, absent or incomplete within the amino acid sequence of native protein, and can be released or activated in vivo during gastrointestinal digestion or food processing.

These bioactive peptides derived from milk proteins have been shown to have a variety of different functions in vitro and in vivo, e.g. effect on nervous system, opioid, antimicrobial, immunomodulatory, anti-thrombotic, antihypertensive, antioxidant and mineral-carrying.

This article will review the current knowledge about activity and getting of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. Special attention was given to enzymatic hydrolysis and milk fermentation that leads to the formation of peptides with this activity and contribute to control of blood pressure.

Key Words:

Bioactive peptides, milk proteins, functional foods, angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides.

INTRODUÇÃO

O leite é conhecido pelas suas importantes propriedades nutricionais que contribuem para a boa formação dos ossos, músculos e dentição, mas também por apresentar constituintes com propriedades bioactivas relevantes tanto para crianças como para adultos e idosos¹. São de destacar as proteínas que para além do importante papel fisiológico, apresentam propriedades bioactivas que contribuem para o bom funcionamento do organismo²⁻¹⁹. Deste modo, muitas proteínas do leite possuem propriedades biológicas específicas que tornam estes componentes potenciais ingredientes promotores de saúde.

As proteínas do leite podem ser divididas em três grupos²⁰:

1. Caseínas no estado coloidal, na fracção micelar;
2. Proteínas solúveis designadas por proteínas do soro;
3. Proteínas das membranas dos glóbulos de gordura (pequena %, que têm sido pouco estudadas);

As caseínas incluem cinco tipos de moléculas: α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN e γ -CN, que juntas formam partículas complexas ou micelas. No leite de vaca representam uma fracção de 80% e são insolúveis a pH = 4,6.^{7,20}

As proteínas do soro representam 20% das proteínas do leite e mantêm-se solúveis após precipitação ácida das caseínas (pH=4,6), ou pela renina a pH 6,7, a 30-32°C. Apresentam uma estrutura globular, particularmente rígida e compacta.

O interesse pelas proteínas do soro do leite é relativamente recente, tendo o desenvolvimento, nos anos 70, de processos de ultra centrifugação facilitado a sua purificação. De tal modo que se verifica uma aplicação crescente destas proteínas e dos respectivos hidrolisados na indústria alimentar. Face às suas propriedades emulsificantes, gelificantes e às suas características de viscosidade e solubilidade, o seu emprego é relevante em bebidas, produtos lácteos e cárneos, produtos de pastelaria, sopas, molhos, condimentos, etc.²¹⁻²⁴

A BSA e as imunoglobulinas (IgG₁, IgG₂, Ig A, Ig M) são proteínas do sangue, representando estas últimas um grupo bastante complexo e heterogéneo de proteínas. No colostro, as IgG₁, IgG₂ constituem aproximadamente 80% das proteínas do soro e são as principais responsáveis pela imunização passiva dos lactentes.^{5,12,13,21}

As proteases-peptonas têm sido identificadas como produtos de degradação proteolítica da β -lactoglobulina. A lactoferrina e a lactotransferrina são dois tipos de proteínas de ligação ao ferro.^{5,12,13,21}

A Tabela 1 resume a classificação, proporção e massa molecular das principais proteínas do leite.

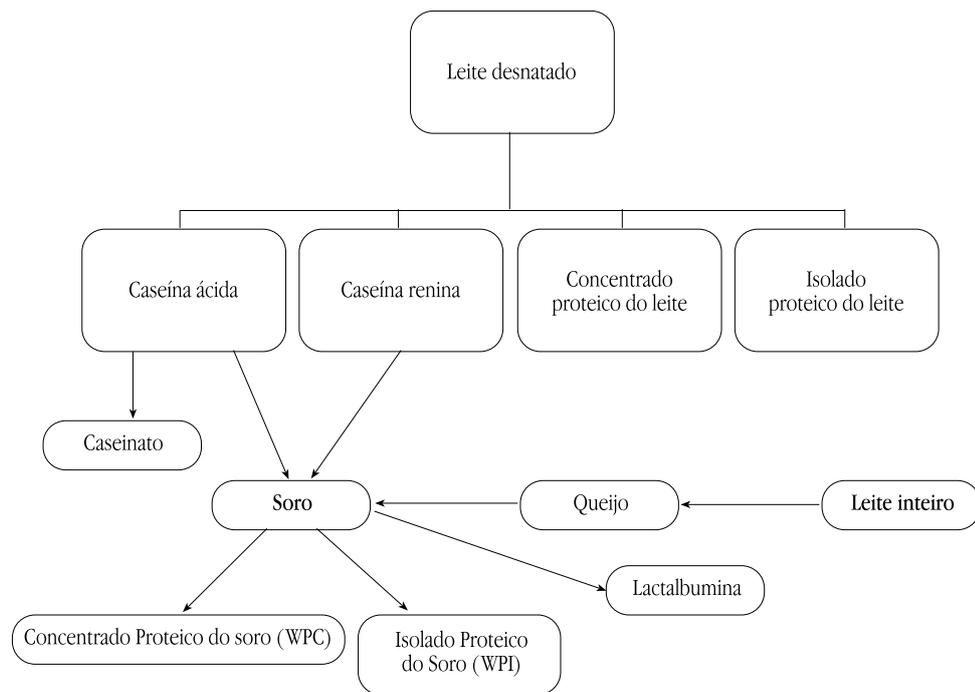
Tabela 1 - Classificação das principais proteínas do leite.

Grupos	Moléculas	Proteínas do leite desnatado (%)	Massa molecular (Da) (valores aproximados)	Aminoácidos
Caseínas (~80% das proteínas)	α_{s1} -CN e α_{s2} -CN	45-55	23600 e 25150	199 e 207
	β -CN	25-35	24000	209
	κ -CN	8-15	19000	169
	γ -CN	3-7	11500 a 20500	-
Proteínas do soro (~20% das proteínas)	β -LA	7-12	18300	162
	α -LA	2-5	14146	123
	BSA	0,7-1,3	66300	582
	Imunoglobulinas:	1,9-3,3	-	-
	IgG ₁	1,2-3,3	162000	-
	IgG ₂	0,2-0,7	152000	-
	Ig A	0,2-0,7	400000	-
	Ig M	0,1-0,7	950000	-
	Protease-peptonas	2-4	4000-40000	-
	Lactoferrina	0,2-0,8	80000	-
	Lactotransferrina	-	-	-
	Enzimas:			
Lactoperoxidase	-	-	-	
Lisozima	-	-	-	

As principais proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro, podem ser isoladas recorrendo a várias tecnologias de separação.²¹⁻²⁴ Podem ainda ser processadas para criar uma vasta gama de ingredientes com propriedades funcionais. Estes ingredientes incluem: concentrados proteicos do leite, isolados de proteínas do leite, caseínas, caseinatos, concentrados proteicos do soro (WPC), isolados de proteínas do soro (WPI), hidrolisados e várias fracções do leite.

Na Figura 1 encontram-se esquematizados os ingredientes de natureza proteica que é possível obter de leite desnatado ou de leite inteiro.

Figura 1 - Esquema dos ingredientes das proteínas produzidas a partir de leite desnatado ou inteiro.

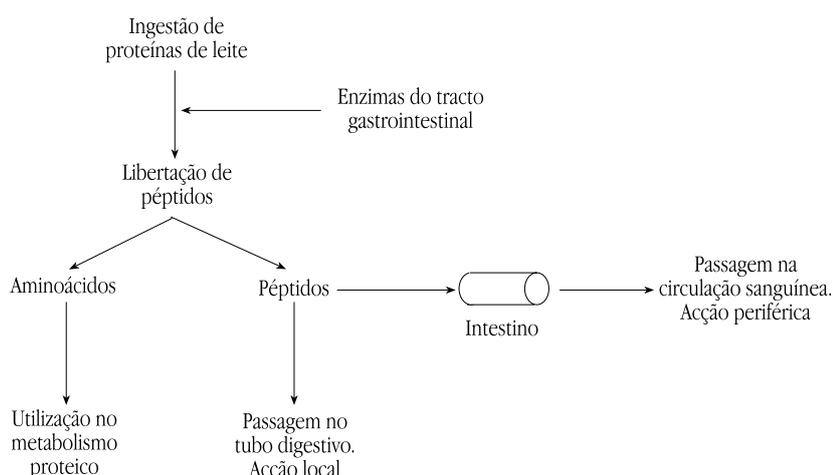


As proteínas do leite podem originar *in vivo* péptidos bioativos que influenciam numerosas respostas fisiológicas.¹⁻¹⁹ Normalmente os péptidos encontram-se no estado inactivo nas proteínas nativas sendo libertados através da hidrólise pelas enzimas digestivas ou através da hidrólise por microorganismos proteolíticos e pela acção de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos ou plantas. Estes péptidos contêm 3-20 resíduos de aminoácidos por molécula e a sua actividade baseia-se na respectiva composição e sequência de aminoácidos. Alguns péptidos apresentam propriedades multifuncionais.

A actividade dos péptidos bioativos, quanto ao seu comportamento como substâncias exógenas reguladoras, isto é, como hormonas alimentares, ainda não está completamente esclarecida.⁶ No entanto, é de realçar que para exercerem esses mesmos efeitos, *in vivo*, têm de ser libertados durante a digestão intestinal e depois atingirem os locais alvo no lúmen do tracto intestinal ou após a (re)absorção em órgãos periféricos.^{1,4-5,15-17,22-30}

Na Figura 2 apresenta-se um esquema da libertação e absorção dos péptidos bioativos no organismo.⁷

Figura 2 - Libertação e absorção de péptidos bioactivos das proteínas do leite.



Uma variedade de peptidases que se localizam nas vilosidades intestinais, vão posteriormente clivar os aminoácidos livres ou dipépticos no N – ou C – terminal ou nas ligações internas dos oligopéptidos.^{5,15} Os péptidos que não são degradados por proteólise intestinal podem, em princípio, ser absorvidos intactos e entrarem na circulação sanguínea.^{5,14} Exemplo disso, são os di e tripéptidos como os imunopéptidos e inibidores de ACE que podem passar através do intestino em quantidades significativas para posteriormente atingirem seus locais alvo. Este facto, pode constituir um pré-requisito para exercerem seu efeito biológico após ingestão oral e/ou infusão intravenosa de péptidos bioactivos ou hidrolisados.^{1,2,4-5}

Existem vários tipos de péptidos bioactivos que apresentam diferentes funções no organismo influenciando os sistemas digestivo, imunológico, cardíaco e nervoso central.^{1-10,22-31} Os seus possíveis efeitos reguladores prendem-se com, por exemplo:

- Mobilidade do tracto gastrointestinal (β -casomorfina);
- Transporte das fezes (β -casomorfina);
- Estímulo da segregação da insulina em função da concentração de glucose (β -casomorfina);
- Captação de nutrientes, como o cálcio e transporte de minerais no tubo digestivo (fosfopéptidos); transporte intestinal de aminoácidos através de receptores opiáceos (ex: influxo de leucina através da membrana das vilosidades intestinais) (β -casomorfina);
- Péptidos antihipertensivos, inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA) (casoquininas);
- Defesa imunitária devida aos fragmentos de α s1- CN e β -CN;
- Péptidos antitrombóticos inibidores da agregação plaquetária (casoplatelinas);

Na Tabela 2 apresentam-se alguns exemplos de péptidos bioactivos derivados de proteínas do leite.

Tabela 2 - Péptidos bioactivos derivados das proteínas do leite.

Péptido bioactivo	Proteína precursora	Bioactividade
Casomorfina	α -, β -CN	Agonistas opiáceos
α -Lactorfina	α -LA	Agonista opiáceo
β -Lactorfina	β -LG	Estímulo não opiáceo no íleo
Serorfina	BSA	Agonista opiáceo
Lactoferrina	Lactoferrina	Agonistas opiáceos
Casoxinas	κ -CN	Agonistas opiáceos
Casoquininas	α -, β -CN	Anti-hipertensivos
Casoplateninas	κ -CN, Lactotransferrina	Anti-trombóticos
Imunopéptidos	α -, β -CN	Imunoestimulantes
Fosfopéptidos	α -, β -CN	Transportadores de minerais

HIPERTENSÃO E PÉPTIDOS COM ACTIVIDADE INIBIDORA DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA I (ECA)

A hipertensão é um factor de risco para as doenças cardiovasculares. Foi identificada como a maior causa de morte, excedendo, nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o tabaco e o colesterol elevado.³² Na Tabela 3 apresenta-se a classificação da tensão arterial de acordo com a OMS.

Tabela 3 - Classificação da tensão arterial – OMS (organização mundial de saúde).

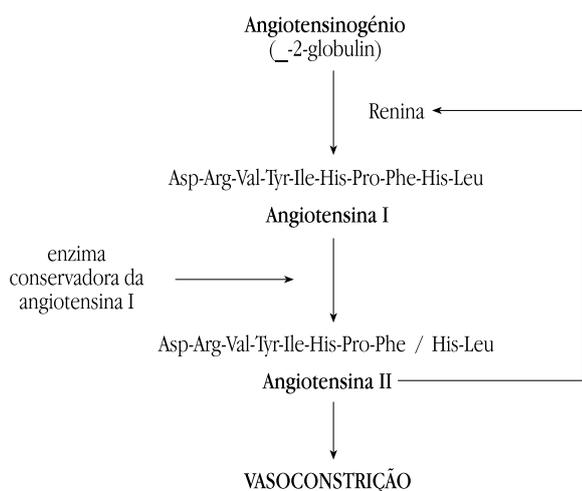
Tensão arterial	Sistólica	Diastólica
Ideal	< 120 mmHg	< 80 mmHg
Normal	< 130 mmHg	< 85 mmHg
Acima do normal	130-139 mmHg	85-89 mmHg
Hipertensão ligeira	140-159 mmHg	90-99 mmHg
Hipertensão moderada	160-179 mmHg	100-119 mmHg
Hipertensão severa	> 180 mmHg	> 110 mmHg

A hipertensão é acompanhada por alterações funcionais do sistema nervoso central simpático, sistema renal, sistema renina-angiotensina além de outros mecanismos humorais e disfunção arterial.³³⁻³⁴

A regulação da pressão arterial é parcialmente dependente do sistema renina-angiotensina. A renina actua no angiotensinogénio que liberta a angiotensina I que é convertida posteriormente, na hormona péptido activa angiotensina II, um vasoconstritor, pela Enzima de Conversão de Angiotensina (ECA; peptidildipeptídeo hidrolase, EC 3.4.15.1).

A angiotensina II ao inactivar um vasodilatador, aumenta a produção de aldosterona que, por sua vez aumentará a retenção de água. Quando a ECA é inibida, a formação de angiotensina II é reduzida e a vasoconstricção arterial é menor, baixando assim, a tensão arterial (Figura 3).

Figura 3 - Esquema do sistema renina angiotensina.



Diversos péptidos resultantes da proteólise das proteínas do leite estão descritos como tendo actividade inibidora da ECA e foram identificados como potenciais redutores da tensão arterial, por exemplo os péptidos da β -caseína, f84-86 (Val-Pro-Pro) e f74-76 (Ile-Pro-Pro) obtidos no leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*.^{1,3,4,6,9,10,11,25} Trata-se de péptidos com aprovação do FOSHU (Foods for Specified Health Use) no Japão devido à sua segurança, eficácia e biodisponibilidade.^{1-11,16,17,22,25,28-30} Estes péptidos apresentam um IC_{50} de 9 e 5 μM , respectivamente.

Mais de vinte ensaios clínicos já foram realizados com os péptidos bioactivos IPP e VPP, durante os últimos 10 anos.^{31,34-45} Estes péptidos bioactivos são mais estáveis no organismo do que outros péptidos lácteos, face ao seu tamanho e estrutura (presença da ligação prolina-prolina)⁴⁸⁻⁴⁹ e, podem ser absorvidos pelo organismo sem que sejam previamente decompostos pelas enzimas digestivas.^{9,10,11,17,50} Ensaio realizado demonstram que estes péptidos se mantêm estáveis no sangue e sob condições de estimulação gastrointestinal.³¹ O consumo de leite fermentado (por exemplo: iogurtes) contendo estes dois péptidos bioactivos, resulta num decréscimo da actividade da ECA^{31,34-44} e, conseqüentemente na redução da pressão arterial de pessoas hipertensas como resultado do decréscimo da angiotensina I. Os níveis de renina aumentam após o consumo destes péptidos mantendo, no entanto os seus níveis dentro dos parâmetros fisiológicos.^{15,17,50,51}

Maruyama e Suzuki⁵² e Maruyama e colaboradores^{53,54} isolaram vários péptidos produzidos por digestão com tripsina da α e β -caseínas, que apresentavam propriedades inibidoras da ECA. Estes péptidos designados casokininas, correspondem às sequências f23-24, f23-27 e f194-199 da α s1-caseína, assim como, o fragmento f177-183 e f193-202 da β -caseína. Foram igualmente isolados péptidos com actividade inibidora da ECA a partir de hidrolisados da κ -caseína e da albumina sérica bovina⁵⁵.

A hidrólise das proteínas do soro também leva à produção de péptidos bioactivos, alguns destes estão descritos como apresentando actividade antihipertensora (Tabela 4), sendo de destacar o péptido ALPMHIR com um IC_{50} de 43 μM .⁵⁶

Tabela 4 - Exemplos de péptidos bioativos das proteínas do soro bovino.

Tratamento	Fragmento peptídico identificado	Sequência	IC ₅₀ (μM) ^a
α-LA com pepsina seguida de tripsina e quimiotripsina	α-LA f (50-52)	Tyr-Gly-Leu	409
α-LA com pepsina	α-LA f (50-53)	Tyr-Gly-Leu-Phe ^b	733
α-LA com tripsina	α-LA f (99-108)	Val-Gly-Ile-Asn-Trp-Trp-Leu-Ala-His-Lys	327
	α-LA f (104-108)	Try-Leu-Ala-His-Lys	77
β-LG com tripsina	β-LG f (22-25)	Leu-Ala-Met-Ala	556
	β-LG f (32-40)	Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg	635
	β-LG f (81-83)	Val-Phe-Lys	1029
	β-LG f (142-148)	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	43
β-LG com pepsina seguida de tripsina e quimiotripsina	β-LG f (94-100)	Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Try-Lys	946
	β-LG f (106-111)	Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala	788
	β-LG f (142-146)	Ala-Leu-Pro-Met-His	521
	β-LG f (102-105)	Try-Leu-Leu-Phe ^b	172
Soro com fermentação e depois pepsina e tripsina	α-LA f (105-110)	Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu	621
	β-LG f (9-14)	Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys	580
	β-LG f (15-20)	Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr	1682
Soro com proteinase K	β-LG f (78-80)	Ile-Pro-Ala	141

^a IC50 concentração de um inibidor de ACE necessária para inibir 50% da actividade da ACE

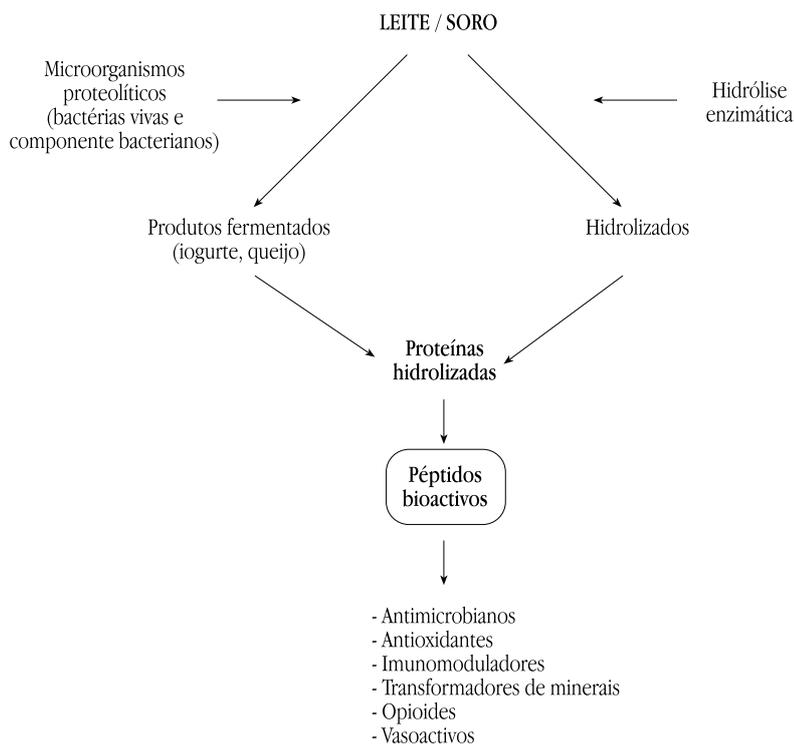
^b usados péptidos sintéticos

Como se pode constatar os péptidos referidos anteriormente não são tão potentes como os medicamentos usados para o tratamento da hipertensão. O Captopril uma droga frequentemente usada no tratamento da hipertensão apresenta um IC₅₀ de 0.006 μM. No entanto, alimentos que apresentam esta bioactividade podem ser incluídos num dieta saudável de modo a contribuir para um melhor controlo da tensão arterial. Alternativamente, o efeito antihipertensivo pode ser obtido por um mecanismo envolvendo a fixação de péptidos nos receptores opióides dos vasos sanguíneos. O péptido α-lactorfina, que tem actividade opióide e deriva da α-lactalbumina, apresenta uma acção anti-hipertensiva reversível com naloxona.⁵⁷

FORMAÇÃO DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS COM ACÇÃO ANTIHIPERTENSORA

Os péptidos bioativos podem ser produzidos a partir das proteínas do leite de três formas:^{1-5,16}

Figura 4 - Potencias funções *in vivo* de produtos fermentados.



1. Hidrólise enzimática com enzimas digestivas;
2. Fermentação do leite com microrganismos proteolíticos;
3. Por acção de enzimas derivadas de microrganismos ou plantas;

É de realçar que além dos processos convencionais de produção de péptidos a partir de proteínas naturais por enzimas proteolíticas é também possível sintetizá-los, com base na produção de sequências similares, por três processos: a) síntese química; b) tecnologia do DNA recombinante; c) síntese enzimática.¹⁵ A técnica de DNA recombinante têm sido experimentada para a produção de péptidos específicos ou seus precursores em microrganismos.

Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é a forma mais comum de produzir péptidos bioativos. A sua caracterização química e identificação tem sido realizada recorrendo a enzimas pancreáticas, de preferência a tripsina. Contudo, também se tem recorrido a outras enzimas e a diferentes combinações de proteinases, incluindo alcalase, quimiotripsina, pancreatina e pepsina, assim como enzimas de fontes bacterianas e fúngicas.^{1-5,10,15}

Este tipo de hidrólise é vantajoso comparativamente à tradicional hidrólise química, ácida ou alcalina, no que respeita à:

- i) Selectividade. As enzimas são específicas para um determinado tipo de ligação química, não sendo frequente o aparecimento de produtos de degradação. Em contraste com a baixa selectividade dos ataques ácido e base e o seu difícil controlo, que conduz ao aparecimento, inevitável de produtos que podem ser tóxicos.
- ii) Condições moderadas de temperatura e pH. A hidrólise enzimática ocorre, geralmente, entre 40 e 60°C com um pH entre 4 e 8.
- iii) Não se adicionam substâncias estranhas. Nos processos de hidrólise química, como posteriormente há necessidade de neutralizar, é elevado o teor em sais.
- iv) O valor nutritivo é mantido, já que não se produz degradação dos componentes separados, a hidrólise alcalina destrói os aminoácidos arginina e cisteína e a hidrólise ácida elimina o triptofano e desamina os aminoácidos serina e treonina.

No entanto, a hidrólise enzimática de proteínas apresenta alguns inconvenientes, nomeadamente, desnaturar a enzima e trabalhar em condições assépticas. É um processo muito lento pelo que pode surgir contaminação microbiana da mistura reaccional.²¹ Este processo envolve custos elevados porque é necessário grande quantidade de enzima e de energia. Foram efectuadas várias tentativas de imobilização de enzimas em bioreactores, mas a sua utilização não foi muito difundida devido à perda de actividade. Uma alternativa é a utilização de reactores de membrana. Estes baseiam-se na diferença de peso molecular entre a enzima e os produtos da hidrólise. A enzima fica retida no lado de retenção da membrana, que está em contacto com o substrato (este também fica retido), enquanto que o produto é suficientemente pequeno para passar através da membrana. A principal vantagem deste método é que permite a reutilização da enzima e facilita o controlo do peso molecular do produto seleccionando membranas com poro adequado.⁵⁸

A extracção em contínuo de péptidos bioactivos em reactores de membrana tem sido aplicada às proteínas do leite, por exemplo, para recuperar péptidos com actividade antitrombótica obtidos da hidrólise de caseinomacropéptido⁵⁹ ou para produzir péptidos com propriedades emulsionantes a partir de β -lactoglobulina⁶⁰. α -Lactorfinas podem ser obtidas por hidrólise contínua a partir de soro de leite de cabra num reactor de ultrafiltração⁶¹.

Para poderem ser usados em dietas especiais ou alimentos funcionais, os hidrolisados de proteínas devem ser: osmoticamente equilibrados, hipoalergénicos, terem valor nutritivo comparável ao da proteína de partida. Por outro lado, não é conveniente que estes produtos alimentares sejam formados somente por aminoácidos livres, uma vez que isso os torna hiperosmóticos, causando diarreia. Adicionalmente, os conhecimentos actuais do mecanismo de absorção intestinal indicam que os di- e tripéptidos são absorvidos com mais facilidade que os aminoácidos livres.²¹

No que respeita às proteases utilizadas podemos classificá-las segundo a sua origem (animal ou vegetal, bacteriana ou fúngica), a sua acção catalítica (endopeptidases ou proteinases, se vão romper ao acaso o interior de cadeias peptídicas; exopeptidases ou peptidases, caso separem aminoácidos e os dipéptidos dos extremos das cadeias polipeptídicas) e a natureza do local catalítico (endopeptidases ser serina-, cisteína-metallo- ou aspartato-proteinases e as exopeptidases amino-,carboxi- ou dipeptidases).

As proteases de origem bacteriana ou fúngica têm tido uma importância crescente ao longo dos últimos anos.

Mecanismos de hidrólise

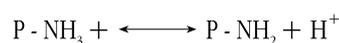
A hidrólise enzimática ocorre através de um conjunto de várias etapas, em série:

Proteínas \longrightarrow Proteoses \longrightarrow Peptonas \longrightarrow Péptidos \longrightarrow Aminoácidos

A protease actua sobre a ligação peptídica, rompendo-a e libertando o grupo amina e o grupo hidroxilo segundo a equação química:²¹



Os grupos amina e carboxilo formados na hidrólise podem estar parcialmente ionizados, de acordo com o pH do processo de hidrólise e segundo os seguintes equilíbrios:



Estima-se que os valores de pK a 25°C para os grupos $-COOH$ e ^+H_3N em polipéptidos estão compreendidos entre 3,1 – 3,6 e 7,5 – 7,8, respectivamente.²¹ Assim, a pH < 3,1-3,6, o grupo ácido estará parcialmente dissociado e a amina parcialmente protonada. Se o pH não for controlado nesta zona, poderá aumentar rapidamente. Trabalhando a pH > 7,5-7,8, o grupo carboxilo estará totalmente dissociado e a amina parcialmente protonada, levando a uma frequência contínua do pH. Deve-se ter presente que a hidrólise de proteínas é um conjunto de reacções simultâneas de ruptura de ligações, com distintas espécies carregadas em equilíbrio, o que demonstra que estes processos são bastante complexos.²¹

Diversos trabalhos realizados nesta área para o estudo da hidrólise enzimática de proteínas visaram determinar as condições óptimas para o processo, com vista à produção industrial. Apenas em alguns casos foi abordada a cinética da reacção, de modo a obter a equação da velocidade, em função das variáveis do

processo, que permitirá obter o reactor correspondente bem como um maior conhecimento e controlo da hidrólise.^{21,62-64}

Fermentação microbiana

A fermentação microbiana representa outro processo de obtenção de péptidos bioactivos podendo ser natural ou controlada. A fermentação microbiana envolve culturas iniciadoras de produtos lácteos, usadas industrialmente, com capacidade proteolítica. Tratam-se de bactérias ácido – lácticas, que degradam proteínas do seu meio circundante aquando do seu crescimento levando à produção de sequências de aminoácidos ou de aminoácidos livres. O grau de proteólise depende das espécies envolvidas, bem como, das condições físicas em que decorre a fermentação. Esta propriedade é tradicionalmente explorada pela indústria alimentar, uma vez que, os péptidos e os aminoácidos resultantes da degradação proteínas do leite, durante a fermentação, contribuem para o *flavor*, o aroma e a textura típica dos produtos.³

O sistema proteolítico das bactérias do ácido láctico, tais como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii, var. bulgaris* é já bem conhecido. Este sistema consiste numa proteinase da parede celular da célula e várias peptidases intracelulares. Recentemente, tem-se verificado um processo rápido na caracterização bioquímica e genética destas enzimas. Pelo menos 16 peptidases, responsáveis pela conversão dos péptidos libertados em aminoácidos livres, foram caracterizadas a partir de bactérias de ácido láctico. O sistema proteolítico das bactérias do ácido láctico fornece sistemas de transporte específicos para aminoácidos, di- e tri-péptidos e oligopéptidos até 18 resíduos.^{1,3,16}

Os oligopéptidos mais longos, que não são transportados para o interior das células, podem constituir uma fonte de libertação de péptidos bioactivos em produtos de leite fermentado se, depois da lise celular, continuarem a ser degradados por peptidases intracelulares. No sistema gastrointestinal, as enzimas digestivas podem ainda degradar oligopéptidos longos, originando a possível libertação de péptidos bioactivos.^{1,3,16}

Uma vez libertados no intestino, os péptidos bioactivos poderão actuar localmente ou passar através das paredes do intestino para a circulação sanguínea, finalizando num órgão alvo, com subsequente regulação de condições fisiológicas através dos sistemas nervoso, imunitário, vascular ou endócrino.^{1,3,16,65}

ALIMENTOS FUNCIONAIS COM PROPRIEDADES ANTIHIPERTENSORAS

Os conceitos na área da nutrição têm vindo a sofrer mudanças significativas nos últimos anos. À parte dos efeitos nutricionais dos alimentos, estes podem ser vistos como potenciais promotores de saúde, aumentando o nosso bem-estar e diminuindo os riscos de doenças consequentes de uma alimentação incorrecta e do próprio envelhecimento da população. Daí ter emergido um novo conceito nutricional: alimento funcional que causou um grande impacto na população. Actualmente, os consumidores estão abertos a novos produtos que visem melhorar a sua saúde e prevenir o aparecimento de doenças.

Está bem documentado que os péptidos bioactivos podem ser gerados durante a fermentação do leite com culturas iniciadoras tradicionalmente usadas na indústria de lacticínios, deste modo, péptidos com diferente bioactividade podem ser encontrados em queijo e leites fermentados⁶⁵⁻⁶⁶.

A proteólise do queijo que ocorre durante a maturação é importante para a obtenção da textura e sabor característico deste produto. As modificações da textura resultam da quebra da rede proteica com formação de péptidos e aminoácidos livres. Estes compostos sofrem posteriores degradações catabólicas com formação de compostos voláteis. Atenção crescente tem sido dada à formação de péptidos, com actividade inibidora da ECA, resultantes da proteólise em diferentes tipos de queijo, nomeadamente, queijo Parmesan⁶⁷, queijo Manchego⁶⁸, queijos Italianos com tempo de maturação médio e longo⁶⁹ e queijos com enzimas modificadas⁷⁰⁻⁷¹.

Os leites fermentados também podem ser uma boa fonte de péptios inibidores da ECA^{45,71}. Actualmente, existem no mercado dois tipos de leites fermentados específicos para regular a tensão arterial que contêm péptidos bioactivos. Uma marca que utiliza um processo de fermentação natural com *Lactobacillus helveticus*, e na outra são adicionados péptidos purificados, obtidos por um processo patenteado. Nesta última os péptidos são extraídos da caseína, que é cindida em pequenos péptidos, por acção enzimática e depois sofrem um processo de secagem por ar quente para produzir a caseína hidrolisada em pó. Esta mistura de péptidos lácteos é depois adicionada ao produto.

O futuro dos lacticínios com propriedades funcionais parece ser promissor, no entanto, ainda há um caminho a percorrer para que estes terem maior impacto em termos de saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Korhonen, H.; Pihlanto-Leppälä, A.: Formation of bioactive peptides from milk proteins through fermentation by dairy starters. In *Bioactive Compounds in Foods. Effects of Processing and Storage*, edited by Tung-Ching Lee and Chi-Tang Ho. *ACS Symposium Series 816, Washington, American Chemical 173-186*, 2002.
- 2 Korhonen, H.: Technology options for new nutritional concepts, *Int. J. Dairy Technol* 55(2): 79-88, 2002.
- 3 Korhonen, H.; Pihlanto-Leppälä, A.: Milk protein-derived bioactive peptides- Novel opportunities for health promotion, *Bull IDF* 363: 17-26, 2002.
- 4 Pihlanto-Leppälä, A.: Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends Food Sci Technol* 11:347-356, 2001.
- 5 Baró, L.; Jiménez, J.; Martínez-Férez, A.; Bouza JJ.: Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales, *Ars Pharmaceutica* 42:3-4: 135-145, 2001.
- 6 Clare, D. A.; Swaisgood, H. E.: Bioactive milk peptides: A prospectus, *J of Dairy Sci* 83: 187-1195, 2000.
- 7 Fosset, S.; Tomé, D.; Activités biologiques des peptides du lait, *Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures* 10,5 :299-305, 2001.
- 8 Meisel, H.; FitzGerald, R.J.: Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects, *Curr Pharm Des* 9(16):1289-1295, 2003.
- 9 Antila, P.; Pihlanto-Leppälä, A.; Paakkari, I.: Bioactive peptides derived from whey proteins. In *Food System Functionality International Conference I, 2002. Web-compilations*, www.msstate.edu/org/fsfa/vol1.htm.
- 10 Haileselassie, S.S.; Lee, B.H.; Gibbs, B.F.: Purification and Identification of Potentially Bioactive Peptides from *Enzyme-Modified Cheese*, *J Dairy Sci* 82(89): 1612-1617, 1999.
- 11 Mizuno, S.; Nishimura, K.; Matsuura, T.; Gotou, Y.; Yamamoto, N.: Release of Short and Proline- Rich Antihypertensive Peptides from Casein Hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* Protease, *J Dairy Sci* 87(10): 3183-3188, 2004.
- 12 Etzel, M.R.: The Emerging Role of Dairy Proteins and bioactive Peptides in Nutrition and Health, *J. Nutr.* 34(4): 9965-10025, 2004.
- 13 Kim, J.I.; Choi, D.Y.; Row, K.H.: Separation of Whey Proteins by Anion-Exchange Membranes, *Korean J. Chem, Eng* 20(3):538-541, 2002.
- 14 Wit, J.N.: Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products, *J Dairy Sci* 81(3), 1998.
- 15 Korhonen, H.; Pihlanto-Leppälä, A.: Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods, *Curr Pharm Des* 9(16): 1297-1308, 2003.
- 16 Pihlanto-Leppälä, A.; Rokka, T.; Korhonen, H.: Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins, *Int. Dairy J* 8: 325-331, 1998.
- 17 Meisel, H.: Overview on Milk Protein-derived Peptides, *Int. Dairy J* 8: 363-373, 1998.
- 18 Mannie, E.: Deconstructing Milk, 2004. www.nutrasolutions.com/articles/current/junedairy.html
- 19 Fiat, Anne-Marie; Migliore-Samour, D.; Jollès, P. et al: Biologically Active Peptides from Milk Protein with Emphasis on Two Examples Concerning Antithrombotic and Immunomodulating Activities", *J Dairy Sci* 76:301-310, 1993.
- 20 Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H.: Chemistry of Milk Constituents. In *Fundamentals of Cheese Science*, edited by Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., Aspen Publishers, Gaithersbury, Maryland 19-44, 2000.
- 21 Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P. et al: Procesos Tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas", *Ars Pharmaceutica* 41(1): 79-89, 2000.
- 22 Meisel, H.; Schlimme, E.: Bioactive peptides derived from milk proteins: Ingredients for functional food, *World Newseletter*, 1998. www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news
- 23 Huffman, L. M.; Harper, W. J.: Maximizing the value of milk through separation technologies, *J Dairy Sci* 82: 2238-2244, 1999.
- 24 Page, J.; Meyer, D.: Reference Manual for US Whey and Lactose Products, 3^{ed}, US Dairy Export Council.
- 25 Silva, S.; Malcata, F.: Caseins as source of bioactive peptides, *Int Dairy J* 15:1-15, 2004.
- 26 Pihlanto-Leppälä, A.; Rokka, T.; Korhonen, H.: Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins, *Int. Dairy J* 8:325-331, 1998.
- 27 Mullally, M.M.; Meisel, H.; Fitzgerald, R.J.: Angiotensin-I-converting Enzyme Inhibitory Activities of Gastric and Pancreatic Proteinase Digests of Whey Proteins, *Int. Dairy J* 7: 299-30, 1997.
- 28 FitzGerald, R. J.; Meisel, H.: Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensina-I-converting enzyme, *British J Nutr* 84(1):33-37, 2000.
- 29 Meisel, H.; Frister, H.; Schlimme, E.: Biologically active peptides in milk proteins, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 28: 267- 278, 1998.
- 30 Yusuf, S.; Lonn, E.; Bosch, J.; Gerstein, H.: Summary of randomized trials of angiotensin converting enzyme inhibitors, *Clin. Exp. Hypertens.* 21:835-45, 1999.
- 31 Kitts, D.D.; Weiler, K.: Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery, *Current Pharmaceutical Design* 9 (16):1309-1323, 2003.
- 32 World Health Report 2002. Geneva, World Health Organisation 2002.
- 33 Cheung, H.S.; Wang F.I.; Ondetti M.A.; Sabo E.F.; Cushman D.W.; Binding of peptide substrates and inhibitors of Angiotensin-converting enzyme, *The Journal of Biological Chemistry* 255 (2):401-407, 1980.
- 34 Hata, Y.; Yamamoto, M.; Ohni, M.; et al: A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects, *Am J Clin. Nutr* 64: 767-771, 1996.
- 35 Itakura, H.; Ikemoto, S.; Terada, S.; et al: The effect of sour milk on blood pressure in untreated hypertensive and normotensive subjects". *J Jap Soc Clin Nutr* 23:26-31, 2001.
- 36 Hirata, H.; Nakamura, Y.; Yada, H.; et al: Clinical effects of new sour milk drink on mild or moderate hypertensive subjects. *J New Rem & Clin* 51:61-9, 2002.

- 37 Kajimoto, O.; Alhara, K.; Hirata, H.; *et al*: Hypotensive effects of the tablets containing, "Lactotriptides (VPP, IPP), *J Nutr Food*, 4:51-61, 2001.
- 38 Kajimoto, O.; Nakamura, Y.; Yada, H.; *et al*: Hypotensive effects of Sour milk in subjects with mild or moderate hypertension, *J Jap Soc Nutr Food Sci* 54:347-54, 2001
- 39 Yasuda, K.; Aihara, K.; Komazaki, K.; *et al*: Effect of large intake of tablets containing "Lactotriptides (VPP,IPP)" on blood pressure, heart rate and clinical parameters in healthy volunteers, *J Nutr Food*, 4:63-72, 2001.
- 40 Kajimoto, O.; Kurosaki, T.; Mizutani, J.; *et al*: Antihypertensive effects of liquid Yogurts containing "Lactotriptides (VPP,IPP)" in mild hypertensive subjects, *J Nutr Food* 5:55-66, 2002.
- 41 Nakamura, Y.; Kajimoto, O.; Kaneko, K.; *et al*: Effects of liquid yogurts containing "Lactotriptides (VPP,IPP)" on high-normal blood pressure, *J Nutr Food* 7:123-137, 2004.
- 42 Mizushima, S.; Ohshige, K.; Watanabe, J.; *et al*: Randomised controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men, *Am. J. Hypertension* 17:701-706, 2004.
- 43 Seppo, L.; Kerojoki, O.; Suomalainen, T.; Korpela, R.: The effect of a Lactobacillus helveticus LBK-16 H fermented milk on hypertension- a pilot study on humans, *Milchwissenschaft*, 57: 124-7, 2002.
- 44 Tuomilehto, J.; Lindstrom, J.; Hyyryen, J.; *et al*: Effect of ingesting sour milk fermented using lactobacillus helveticus bacteria producing peptides on blood pressure in subjects with mild hypertension, *J Human Hypertension*, 18, 795-802, 2004.
- 45 Seppo, L.; Jauhiainen, T.; Poussa, T.; Korpela, R.: A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects". *Am J Clin.Nutr* 77:326-30, 2003.
- 46 Jauhiainen, abstract 8 th Int. Forum for the Evaluation of Cardiovascular Care, Monte Carlo, 2004.
- 47 Mizuno, S.; Matsuura, K.; Gotou, T.; *et al*: Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension, *Br j Nutr* 93: 1-9, 2005.
- 48 Kim, YS.; Brophy, EJ.:Rat intestinal brush border membrane peptidases. I. Solubilization, purification, and physicochemical properties of two different forms of enzyme. *J Biol. Chem* 251:3199-205, 1976.
- 49 Mock, WL.; Green, PC.; Boyer, KD.: Specificity and pH dependence for acylproline cleavage by prolidase, *J Biol. Chem* 265: 19600-5, 1990
- 50 Masuda, O.; Nakamura, Y.; Takano, T.; Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats, *J Nutr* 126 (12): 3063-8, 1996.
- 51 Sipola, M.; Finckenberg, P.; Santisteban, J.; *et al*: Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats", *J. Dairy Res*.69: 103-11, 2000.
- 52 Maruyama, S.; Suzuki, H.: A peptide inhibitor of angiotensin-I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1393-1394, 1982.
- 53 Maruyama, S.; Mitachi, H.; Tanaka, H.; Tomizuka, N.; Suzuki, H.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α -casein. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2557-2561, 1987.
- 54 Maruyama, S.; Nakagomi, K.; Tomizuka, N.; Suzuki, H.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1405-1409, 1985.
- 55 Takano, T.: Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy Sci.* 8, 375-381, 1998.
- 56 Mullally, M.M.; Meisel, H.; FitzGerald, R.J.: Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters* 402, 99-101, 1997.
- 57 Nurminen, M.L.; Sipola, M.; Kaarto, H. *et al*: A-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 66, 1535-1543, 2000.
- 58 Guadix, A.; Camacho, F.; Guadix, E.M.: Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *J Food Eng.* 72, 398-405, 2006.
- 59 Martin-Orue, C.; Henry, G.; Said Bouhallab, S.: Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide: Control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. *Enzyme and Microb. Tech.* 24, 173-180, 1999.
- 60 Bordenave, S.; Sannier, F.; Ricart, G.; Piot, J.M.: Continuous hydrolysis of goat whey in an ultrafiltration reactor: generation of alpha-lactorphin. *Preparative Biochem & Biotechn.* 29, 189-202, 1999.
- 61 Bordenave, S.; Sannier, F.; Ricart, G.; Piot, J.M.: Characterization of goat whey peptic hydrolysate produced by an ultrafiltration membrane enzymic reactor *J. Dairy Res*, 67, 551-559, 2000.
- 62 M.V. Mota; I.M.P.L.V.O. Ferreira; M.B.P.P. Oliveira *et al*: Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrates: peptide HPLC profiles, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol* 27 (16):2621-2635, 2004.
- 63 M.V. Mota; I.M.P.L.V.O. Ferreira; M.B.P.P. Oliveira *et al*: Tripsin hydrolysis of whey protein concentrates: characterisation using multivariate data analysis, *Food Chem.*, 53, 4976-4981, 2006.
- 64 Gauthier, S.F.; Pouliot, Y.: Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci* 86, E78-E87.
- 65 Korhonen, H.; Pihlanto, A.: Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J* 16, 945-960, 2006.
- 66 Silva, S.V., Malcata, F.X.: Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J* 15, 1-15, 2005.
- 67 Addeo, F.; Chianese, L.; Salzano, A.; Sacchi, R.; Cappuccio, U.; Ferranti, P.; Malorni, A.: Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J Dairy Res.* 59, 401-411, 1992.
- 68 Gomez, J.A.; Ramos, M.; Recio, I.: Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J*, 12, 697-706, 2002.
- 69 Smacchi, E.; Gobetti, M.; Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, Pseudomonas fluorescence ATCC 948 and to the angiotensin I converting enzyme. *Enzyme and Microb Techn* 22, 687-694, 1998.
- 70 Haileselassie, S.S.; Lee, B.H.; Bibbs, B.F.: Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J Dairy Sci* 82, 1612-1617.
- 71 Pripp, A.H.; Sorensen, R.; Stepaniak, L.; Sorhaug, T.: Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *IWT* 39(6) 877-683, 2006.
- 72 Walsh, D.J.; Bernard, H.; Murray, B.A.; MacDonald, J.; Pentzien, A.K.; Wright, G.A.; Wal, J.M.; Struthers, A.D.; Meisel, H.; FitzGerald, R.J.: In vitro generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). *J Dairy Sci* 87, 3845-3857.