

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Utilização de hidrolisados enzimáticos de peixes para obtenção de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

Renata Alexandra Moreira das Neves

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Neves, Renata Alexandra Moreira das
N514u Utilização de hidrolisados enzimáticos de peixes para
obtenção de peptídeos inibidores da enzima conversora
da angiotensina I (ECA). / Renata Alexandra Moreira das
Neves -- São Paulo, 2005.
94p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

1. Peixes : Ciência dos alimentos 2. Proteínas : Ciência
dos alimentos 3. Enzima: Ciência dos alimentos I. T. II.
Lanfer Marquez, Ursula Maria, orientador

641.392 CDD

Renata Alexandra Moreira das Neves

Utilização de hidrolisados enzimáticos de peixes para obtenção de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 12/06 de _____.

***Dedico este trabalho,
Aos meus pais, Jaecí e Edna, por serem e terem sido ao longo
da minha existência meus primeiros incentivadores;
E aos meus irmãos, Angélica e Junior, pelo incentivo e apoio
durante a realização deste trabalho.***

Agradecimentos,

À professora Ursula Maria Lanfer Marquez pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho;

À professora Adriana Carmona pelo enorme apoio recebido quando necessitei utilizar o seu laboratório e equipamentos necessários à elaboração deste trabalho;

Ao Márcio Alves, pela “grande” ajuda na realização dos ensaios de inibição da ECA e toda a equipe de pós-graduandos do laboratório de biofísica da UNIFESP;

Aos bibliotecários Ângelo, Adriana e Leila pela amizade e boa vontade;

Aos colegas de laboratório (Patrícia, Rosinha, Cíntia, Thaís, Bárbara, Taís, Luciana, Otília) os que passaram pelo laboratório, e os que estão começando, obrigada pela companhia, colaboração, amizade e pelos momentos de alegria;

Aos amigos que fiz (Malu, Elaine, Luciana Setaro, Aline, Rogério, Alessandro, Ricardo, Cristina, Fabiana) durante a pós-graduação, os quais sempre estiveram do meu lado, em todos os momentos vividos, de alegria e tristezas, em São Paulo, em especial a Elma Regina Wartha, Claudia Passos, Karla Oliveira e Priscilla Podadera. Nunca esquecerei vocês;

À minha grande amiga Elma Regina Wartha, um agradecimento especial, por TUDO. Você praticamente me acompanhou durante toda a minha estadia em São Paulo, durante toda a pós-graduação. Obrigada, principalmente pelas horas dedicadas a minha tese de doutorado;

À todos os alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (Lurdinha, Elaine, Jorge, Tânia, Mônica, Vítor), que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Mauricio, que acompanhando toda a minha trajetória no doutorado, me deu força, palavras de incentivo e amor e quero que saiba que você se fez mais importante ainda, nos momentos de finalização desta tese. Meu muito obrigado;

Em especial, a toda minha família (pais, irmãos, tios, primos e avós), que sempre estiveram ao meu lado, se preocupando e torcendo por mim.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE QUADROS	V
LISTA DE AMINOÁCIDOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Hipertensão arterial sistêmica	03
2.1.1 <i>Epidemiologia</i>	05
2.1.2 <i>Patogênese</i>	08
<i>Sistema renina angiotensina</i>	09
<i>Enzima conversora da angiotensina I</i>	10
<i>Medida da atividade da enzima conversora da angiotensina I</i> <i>(ECA)</i>	14
2.1.3 <i>Tratamento</i>	17
<i>Tratamento medicamentoso</i>	18
<i>Tratamento não-medicamentoso</i>	22
2.2 Peptídeos biologicamente ativos	23
2.2.1 <i>Peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I</i> <i>(ECA)</i>	27
2.2.2 <i>Peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I</i> <i>(ECA) obtidos de proteínas alimentares</i>	29
2.2.3 <i>Medida da atividade inibidora da ECA pelos peptídeos inibidores</i> <i>da ECA</i>	32
2.2.4 <i>Efeitos fisiológicos dos peptídeos inibidores da ECA</i>	33

“In Vitro”	33
“In Vivo”	35
2.3 Peixes como fonte de nutrientes e peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA)	37
2.3.1 <i>Produção de pescado</i>	37
2.4 Hidrolisados protéicos	39
3. OBJETIVOS	45
3.1 Geral	45
3.2 Específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Material	46
4.1.1 <i>Amostras</i>	46
4.1.2 <i>Reagentes</i>	46
4.1.3 <i>Equipamentos e materiais especiais</i>	47
4.2 Métodos	47
4.2.1 <i>Obtenção dos peptídeos por hidrólise enzimática</i>	47
4.2.2 <i>Análise da composição química dos “minced”</i>	49
4.2.3 <i>Fracionamento do hidrolisado utilizando membranas de ultrafiltração</i>	50
4.2.4 <i>Fracionamento do hidrolisado por cromatografia em gel</i>	50
4.2.5 <i>Análise do teor protéico nas frações peptídicas</i>	51
4.2.6 <i>Medida da atividade inibitória da ECA por ensaio “in vitro”</i>	51
4.2.7 <i>Ensaio de digestibilidade “in vitro” do “minced” de tilápia</i>	52
4.2.8 <i>Estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA presentes nos hidrolisados quando submetidos a hidrólise “in vitro” que mimetiza o processo de digestão</i>	53
4.2.9 <i>Grau de hidrólise</i>	53

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Composição química do “minced” de tilápia e corvina.....	56
5.2 Caracterização dos hidrolisados obtidos a partir dos “minced” de tilápia e corvina	57
5.3 Otimização da medida da atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA) por ensaio “in vitro” descrita por ARAÚJO <i>et al.</i> , (2000).....	59
5.4 Atividade inibitória dos hidrolisados de “minced” de tilápia e corvina obtidos pelo uso da pepsina seguida da protease de <i>Streptomyces griseus</i>	61
5.5 Tempo de hidrólise versus atividade inibitória do hidrolisado de tilápia (pepsina/ <i>Streptomyces griseus</i>)	63
5.6 Estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA presentes nos hidrolisados quando submetidos a hidrólise “in vitro” que mimetiza o processo de digestão	65
5.7 Atividade inibidora dos domínios C e N da ECA pelos hidrolisados de Corvina e Tilápia	67
5.8 Estudo da liberação de peptídeos inibidores da ECA a partir dos peixes por enzimas gastrointestinais	69
Ensaio com a tripsina e quimotripsina	71
5.9 Fracionamento dos hidrolisados dos “minced” de tilápia e corvina obtidos pelo uso do sistema enzimático pepsina / <i>Streptomyces griseus</i> por cromatografia em gel	73
Cálculo do valor IC ₅₀	77
5.10 Fracionamento do hidrolisado utilizando membranas de ultrafiltração .	79
5.11 Atividade inibitória dos hidrolisados de “minced” de tilápia e corvina obtidos pelo processo de autólise	81
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mortalidade no Brasil, no ano de 2002 (MS/SVS/DASIS,2002) ..	06
FIGURA 2	Mortalidade no Brasil, no ano de 2002, por doenças cardiovasculares (MS/SVS/DASIS, 2002)	07
FIGURA 3	A função da enzima conversora da angiotensina I no sistema renina-angiotensina e sua participação no sistema calicreína-renina	11
FIGURA 4	Modelo proposto da estrutura da enzima conversora da angiotensina I (ECA)	13
FIGURA 5	Conversão do hipuril-histidil-leucina pela ECA em ácido hipúrico (CUSHMAN e CHEUNG, 1971)	15
FIGURA 6	Hidrólise do peptídeo sintético do tipo Abz-peptidil-K(Dnp)-X-OH pela ECA (ARAÚJO <i>et al.</i> , 2000)	17
FIGURA 7	Estrutura química dos inibidores captropil, enalapril e fosinopril .	21
FIGURA 8	Modelo hipotético de interação entre a ECA e seus substratos proposto por ONDETTI <i>et al.</i> (1977)	29
FIGURA 9	Fluxograma do processo de preparação do hidrolisado protéico de pescado	48
FIGURA 10	Produção pesqueira do peixe corvina, controlada por mês, no ano de 2000 (Instituto de Pesca do Estado de São Paulo)	55
FIGURA 11	Efeito do grau de hidrólise sobre a atividade inibidora da ECA ...	64
FIGURA 12	Atividade inibitória dos hidrolisados de tilápia e corvina em relação à ECA (dois domínios ativos), ECA N (domínio C ativo) e ECA C (domínio C ativo)	68
FIGURA 13	Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de corvina e tilápia com pepsina/ <i>Streptomyces griseus</i> e de suas respectivas frações A (> 30kDa), B (10 a 30kDa) e C (< 10kDa) obtidas dos hidrolisados	72
FIGURA 14	Efeito do tempo de hidrólise das proteínas do “minced” de tilápia, com as enzimas tripsina e quimotripsina, sobre a atividade inibitória da ECA	73

FIGURA 15	Perfil cromatográfico do hidrolisado de peixe tilápia (pepsina / protease de <i>Streptomyces griseus</i>) H _{T1} , em coluna empacotada com Sephadex G-25	74
FIGURA 16	Atividade inibitória das frações peptídicas do H _{T1} , expressa como IC ₅₀ , obtidas após cromatografia em gel Sephadex G-25 .	75
FIGURA 17	Perfil cromatográfico do hidrolisado de peixe tilápia (pepsina / protease de <i>Streptomyces griseus</i>) H _{T1} , em coluna empacotada com Sephadex G-15	75
FIGURA 18	Atividade inibitória das frações peptídicas do H _{T1} , expressa como IC ₅₀ , obtidas após cromatografia em gel Sephadex G-15 .	76
FIGURA 19	Perfil cromatográfico do hidrolisado de peixe corvina (pepsina / protease de <i>Streptomyces griseus</i>) H _{C1} , em coluna empacotada com Sephadex G-25	78
FIGURA 20	Atividade inibitória das frações peptídicas do H _{C1} , expressa como IC ₅₀ , obtidas após cromatografia em gel Sephadex G-25 .	78
FIGURA 21	Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de corvina e tilápia com pepsina/ <i>Streptomyces griseus</i> e de suas respectivas frações A (> 30kDa), B (10 a 30kDa) e C (< 10kDa) obtidas dos hidrolisados.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Classificação da pressão arterial (>18 anos)	04
TABELA 2	Valores de pressão arterial (PA) referentes aos percentis 90 e 95 de pressão arterial para meninos de 1 a 17 anos de idade, de acordo com o percentil de estatura, segundo JNC 7 (2003)	05
TABELA 3	Classes de antihipertensivos e seus mecanismos de ação no controle da pressão arterial	19
TABELA 4	Agentes hipertensivos, inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA), disponíveis comercialmente no Brasil	20
TABELA 5	Modelos de digestão propostos por VERMEIRSEN <i>et al.</i> (2003) para estudos da resistência de peptídeos a digestão gastrointestinal	35
TABELA 6	Sistemas enzimáticos utilizados para a obtenção dos hidrolisados e seus respectivos graus de hidrólise	49
TABELA 7	Condições de hidrólise do “minced” de tilápia	52
TABELA 8	Composição química das amostras dos “minced” de peixes.	57
TABELA 9	Recuperação protéica e Grau de hidrólise nos hidrolisados H _{T1} e H _{C1}	58
TABELA 10	Atividade inibitória dos hidrolisados de tilápia (H _{T1}) e corvina (H _{C1}) obtidos pela ação da pepsina seguida da protease de <i>Streptomyces griseus</i>	61
TABELA 11	Estabilidade dos hidrolisados originais H _{T1} e H _{C1} submetidos às enzimas gastrointestinais, onde H _{T1} P e H _{C1} P correspondem aos hidrolisados submetido a ação da pepsina por 2h e H _{T1} PTQ e H _{C1} PTQ, aos hidrolisados H _{T1} P e H _{C1} P submetidos a ação das enzimas tripsina e quimotripsina, por 2,5h	66
TABELA 12	Grau de hidrólise do “minced” de tilápia submetido ao ensaio de digestibilidade com as enzimas pepsina (2h) e tripsina + quimotripsina (2,5h) versus atividade inibitória	70
TABELA 13	Comparação da atividade inibitória do “minced” hidrolisado com enzimas gastrointestinais e do hidrolisado produzido pela ação das enzimas pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	70

TABELA 14 Atividade inibitória dos hidrolisados de tilápia, H_{T1} e H_{C1} e dos hidrolisados obtidos pelo processo de autólise, A_T (autólise 80 tilápia) e A_C (autólise corvina)

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Identificação dos peptídeos bioativos derivados das proteínas do leite, adaptado de PIHLANTO-LEPPÄLÄ (2001)	24
QUADRO 2	Exemplos de peptídeos biologicamente ativos	25
QUADRO 3	Estrutura dos primeiros peptídeos inibidores da ECA isolados do veneno da cobra brasileira <i>Bothrops jararaca</i>	27
QUADRO 4	Peptídeos inibidores da ECA obtidos de diferentes fontes de proteínas alimentares	30
QUADRO 5	Peptídeos do pescado com atividade inibitória da ECA	31
QUADRO 6	Enzimas proteolíticas utilizadas no processo de hidrólise das proteínas do peixe ^a	43

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
B	Asx	Asparagina ou aspartato
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
X	-	Aminoácido desconhecido ou diferente do
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina ou glutamato

RESUMO

Peptídeos bioativos são de grande interesse tanto para a indústria farmacêutica como para a de alimentos e são obtidos a partir da hidrólise enzimática de várias fontes protéicas, como as do leite, glúten de milho, soja, e músculos de suínos, aves e peixes. Estes peptídeos podem desempenhar atividades benéficas para a saúde, entre elas, a regulação ou inibição de enzimas, com destaque à inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA). Esta enzima é responsável pela clivagem de dois importantes substratos envolvidos na regulação da pressão arterial, a angiotensina I e a bradicinina. Neste trabalho foi estudada a atividade inibitória da ECA em hidrolisados dos peixes tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus* – linhagem tailandesa) e corvina (*Micropogonias furnieri*). Os “minced” destes peixes foram hidrolisados com pepsina e proteases de *Streptomyces griseus* por 5 horas em condições ideais de pH e temperatura. A atividade inibitória foi avaliada pela medida da atividade residual da enzima sobre substrato sintético fluorescente. Os hidrolisados com um grau de hidrólise de cerca de 34% apresentaram atividade inibitória semelhante, com valor de $IC_{50} = 0,040$ e $0,036$ mg proteína/mL, respectivamente para a tilápia e a corvina. Observou-se aumento da atividade inibitória com o progresso da hidrólise, sendo que este aumento também está relacionado com a especificidade das enzimas proteolíticas. Em outro experimento observou-se que os peptídeos presentes no hidrolisado de tilápia inibiram indistintamente os domínios C e N terminais da ECA, não demonstrando especificidade. A atividade inibitória dos hidrolisados foi mantida após submetê-los à ação de enzimas proteolíticas gastrointestinais, indicando a sua provável estabilidade “in vivo”. Da mesma forma, o minced de tilápia quando incubado sucessivamente com pepsina/tripsina/quimotripsina produziu peptídeos ativos ($IC_{50} = 0,025$ mg proteína/mL). Apesar do reduzido grau de hidrólise obtido neste ensaio (17%), os peptídeos liberados apresentaram atividade inibitória elevada, confirmando que a atividade não está relacionada apenas com o grau de hidrólise, mas também com a

sequência de aminoácidos, liberados em função da especificidade das enzimas. Concluiu-se que o consumo destes peixes, ou seus respectivos hidrolisados poderá eventualmente, auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão, embora estudos "in vivo" sejam necessários para comprovar as suas funções biológicas.

Palavras-chave: hidrolisado de peixe; peptídeos bioativos; inibição da enzima conversora da angiotensina I

ABSTRACT

Bioactive peptides have been highly valued by pharmaceutical industries and by food industries as well. These peptides can be released by the enzymatic hydrolysis of various protein sources such as milk, corn gluten, soybean, muscles of pigs, chicken and fish and have been recognized to exhibit important health benefits. Among these, the regulation or inhibition of enzymes, like the inhibition of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) have been focused. This enzyme is responsible for the cleavage of two important substrates, angiotensin I and bradykinin, both of them involved with the regulation of blood pressure. In this study the inhibitory activity of hydrolysates from tilapia tailandesa (*Oreochromis niloticus* – linhagem tailandesa) and corvina (*Micropogonias furnieri*) was evaluated. The hydrolysates of the minced fishes were produced in a 5-hour lasting controlled process under optimal conditions of pH and temperature by the sequential action of pepsin and enzymes from *Streptomyces griseus*. Inhibitory activity was evaluated by measuring the residual activity of the enzyme on a synthetic fluorescent peptidic substrate. The extent of hydrolysis was about 34% and the hydrolysates of tilapia and corvine showed similar inhibitory activity (IC_{50} of 0.040 and 0.036 mg protein/mL), respectively. An increase of activity proportional to the degree of hydrolysis was observed, as well as a relationship with the specificity of the enzymes used. In another experiment it was observed that the bioactive peptides present in the hydrolysate of tilapia did not show specificity for the C- and N-terminal catalytic domains of the angiotensin I-converting enzyme. The inhibitory activity of the hydrolysates was still active after a further hydrolysis by gastrointestinal enzymes, which seems to indicate an eventual activity *in vivo*. In a similar way, when the minced tilapia was consecutively incubated with pepsine, trypsin, chymotrypsin active peptides were produced with an activity of $IC_{50} = 0.025$ mg protein/mL. Despite the low extend of hydrolysis of about 17%, a high inhibitory activity was observed confirming that activity is not only related to the degree of hydrolysis but also to the sequence of

aminoacids and therefore, to the specificity of the enzymes as well. It was concluded that the intake of fish or fish hydrolysates has the potential to help control or to prevent hypertension by a non-drug food-based treatment.

Key-words: fish hydrolysate; bioactive peptides; angiotensin I-converting enzyme inhibition

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos biologicamente ativos têm sido obtidos pela hidrólise enzimática de diversas fontes protéicas e são de grande interesse para a indústria farmacêutica, bem como para a formulação de alimentos. Pesquisas têm demonstrado que esses peptídeos apresentam atividade biológica, principalmente, regulando ou inibindo enzimas, atuando como antibióticos, hormônios, agentes antivirais e antibacterianos ou imunomoduladores e também exibindo atividade antioxidante.

Dentre os peptídeos que atuam sobre a atividade enzimática, especial atenção tem sido dada aos peptídeos que inibem a enzima conversora da angiotensina I (ECA). Esta enzima é responsável pela clivagem de dois importantes substratos envolvidos na regulação da pressão arterial, a angiotensina I e a bradicinina. Peptídeos obtidos por hidrólise enzimática que desempenham essa função foram identificados nos hidrolisados enzimáticos de proteínas do leite, do plasma bovino, nas proteínas do músculo de suínos e também em hidrolisados de peixes.

O emprego desses peptídeos ou estruturas análogas tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, e acredita-se que a ingestão desses peptídeos, na forma de hidrolisados ou presentes em alimentos formulados, possa auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão.

A identificação de peptídeos com atividade inibidora da ECA em hidrolisados de peixes, como sardinha, atum, bacalhau e bonito, justifica a continuidade das pesquisas em hidrolisados de peixes produzidos no Brasil quanto à presença e caracterização desses peptídeos. Foram selecionados os peixes tilápia (*Oreochromis niloticus* – linhagem tailandesa) e Corvina (*Micropogonias furnieri*), cuja escolha se baseou no fato destes peixes serem amplamente consumidos no Brasil, por apresentarem baixo teor de gordura em relação a outros pescados e uma produção ininterrupta no decorrer do ano. Vale ressaltar que a corvina é um peixe característico da costa brasileira e a tilápia, um peixe de consumo mundial, bastante cultivado por

meio da aqüicultura, com destaque para o gênero *Oreochromis*. Atualmente, a tilápia tailandesa, linhagem desenvolvida no Japão, melhorada na Tailândia e introduzida no Brasil em 1996, é a mais cultivada.

Pretendeu-se neste trabalho, dando continuidade a linha de pesquisa sobre os peptídeos com atividade anti-hipertensiva, estudar a presença destes peptídeos presente em hidrolisados enzimáticos obtidos a partir dos peixes tilápia e corvina, determinar uma metodologia mais rápida para medir a atividade inibitória da ECA e por fim, estudar os fatores correlacionados, como o grau de hidrólise, especificidade dos peptídeos inibidores da ECA perante os domínios C e N da ECA e a estabilidade destes peptídeos inibidores quando submetidos ao processo de digestibilidade "in vitro".

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica

O coração é um órgão muscular responsável por bombear o sangue para os pulmões (*para ser oxigenado*) e depois para o corpo, através das artérias, suprindo as necessidades de oxigênio e nutrientes. Esse fluxo sanguíneo exerce uma força contra a parede dos vasos gerando uma tensão na parede das artérias, denominada de pressão arterial.

Uma disfunção nesse mecanismo leva a um aumento na pressão sanguínea causando aumento do tônus muscular liso das arteríolas, o qual aumenta a resistência vascular para o transporte do fluxo sanguíneo. Com isso, haverá um aumento de carga no ventrículo esquerdo do coração, bomba responsável pela perfusão do sangue através do sistema, levando ao seu alargamento, e se a resistência vascular aumentada permanecer sem tratamento ocorrerá falência cardíaca.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou simplesmente hipertensão arterial, mais conhecida como "Pressão Alta", é uma doença ou pode ser definida como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. É caracterizada por uma elevação da pressão arterial para números acima dos valores considerados normais (140/90mmHg). Não existe uma combinação precisa de medidas para se dizer qual é a pressão normal, mas em termos gerais, diz-se que o valor de 120/80mmHg é o valor considerado ideal. Contudo, medidas até 140mmHg para a pressão sistólica e 90mmHg para a diastólica podem ser aceitas como normais (JOINT NATIONAL COMMITTEE 7, 2003).

No ano de 2003, o "National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee", o qual representa organizações de profissionais, voluntários e agências federais de saúde dos Estados Unidos, divulgou no JNC 7, uma nova classificação da pressão sanguínea, onde foi adicionada

uma nova categoria, designada de pré-hipertensão, por representar uma alta porcentagem da população.

Comparando a classificação da pressão arterial, observada na **TABELA 1**, com a publicada no Joint National Committee on Prevention, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure – JNC 6 (1997), observam-se além da inclusão do estágio de pré-hipertensão, a união dos estágios 2 e 3 da hipertensão em uma única categoria.

TABELA 1 – Classificação da pressão arterial (> 18 anos)

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Normal	< 120	< 80
Pré-hipertensão	120 - 139	80 - 89
Hipertensão		
<i>Estágio 1</i>	140 - 159	90 - 99
<i>Estágio 2</i>	≥ 160	≥ 100

Fonte: JNC 7, 2003

A parte da população que se enquadra nessa faixa de classificação, pré-hipertensão, apresenta duas vezes mais o risco de desenvolver hipertensão com relação às pessoas que apresentam valores mais baixos de pressão; devendo-se, portanto, iniciar o tratamento, reduzindo a pressão arterial e prevenindo o desenvolvimento da hipertensão.

A classificação da pressão arterial para crianças e adolescentes é feita de acordo com os percentuais de estatura (PA sistólica e diastólica por percentil de altura), **TABELA 2**, para ambos os sexos. Valores menores de 90 são classificados de normotensos; de 90 a 95, limítrofe e maior ou igual a 95, de hipertensos (SBH/SBC/SBN, 2002).

Um menino com 16 anos de idade, medindo 180cm (percentil 75, de acordo com o gráfico de desenvolvimento de meninos para cálculo do percentil de altura) e apresentando pressão arterial de 120/80mmHg será considerado normotenso. Já outro menino de mesma idade e mesma altura, mas com pressão arterial de 134/88mmHg será considerado limítrofe. Se este menino, ao invés de 180cm, tivesse estatura de 175cm (percentil 50), o nível tensional de 134/88 mmHg o faria ser considerado hipertenso.

TABELA 2 – Valores de pressão arterial (PA) referentes aos percentis 90 e 95 de pressão arterial para meninos de 1 a 17 anos de idade, de acordo com o percentil de estatura, segundo JNC 7 (2003)

Idade (anos)	Percentil	PA sistólica (mmHg) por percentil de altura							PA diastólica (mmHg) por percentil de altura						
		5%	10%	25%	50%	75%	90%	95%	5%	10%	25%	50%	75%	90%	95%
1	90	94	95	97	99	101	102	103	49	49	50	51	52	53	54
	95	98	99	101	103	105	106	107	54	54	55	56	57	58	58
...
16	90	126	127	129	131	132	134	134	81	82	82	83	84	85	86
	95	130	131	133	134	136	138	138	86	86	87	88	89	90	90
17	90	128	129	131	133	135	136	137	83	84	85	86	87	87	88
	95	132	133	135	137	139	140	141	88	88	89	90	91	92	93

Várias tabelas para classificação da pressão arterial apresentando categorias diferentes são encontradas, portanto, há necessidade de extrema cautela antes de rotular algum paciente como sendo hipertenso, tanto pelo risco de falso-positivo, como pela repercussão na própria saúde do indivíduo e o custo social resultante.

No diagnóstico da hipertensão, além das medidas da pressão arterial, devem-se considerar os fatores de risco, a lesão de órgãos-alvo e as comorbidades associadas. Na verdade, o que todos concordam é que a pressão arterial acima de 120/80mmHg diminui a expectativa de vida do indivíduo (SBH/SBC/SBN, 2002).

2.1.1 Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das mais importantes causas de morbi-mortalidade universal, sendo responsável pela redução da expectativa e qualidade de vida. Afeta 50 milhões de indivíduos nos Estados Unidos e aproximadamente um bilhão no mundo. Além de apresentar alto custo médico-social, sendo responsável por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e de absenteísmo no trabalho, a hipertensão arterial

é considerada um dos principais fatores de risco de morbidade e mortalidade cardiovascular (JNC 7, 2003).

A hipertensão tem sido identificada como um dos fatores de risco prevalentes para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCV). A pressão elevada pode: a) levar à ruptura de vasos sanguíneos de grande calibre no cérebro (acidente vascular cerebral) e dependendo da parte do cérebro que é afetada, pode causar paralisia, demência, cegueira ou múltiplas outras doenças cerebrais graves; b) provocar hemorragias múltiplas nos rins, produzindo insuficiência renal, uremia e morte; e c) exercer uma carga de trabalho excessivo sobre o coração, propiciando o desenvolvimento precoce de cardiopatia congestiva e/ou cardiopatia coronária, causando quase sempre morte em consequência de ataque cardíaco (AMENTA, DI TULLIO, TOMOSSONI, 2003; ROSS, 1986).

Em 2002, foram registrados 983 mil óbitos no Brasil. Desse total, as doenças cardiovasculares (**FIGURA 1**) foram responsáveis por 27% dos óbitos (MS/SVS/DASIS,2002).

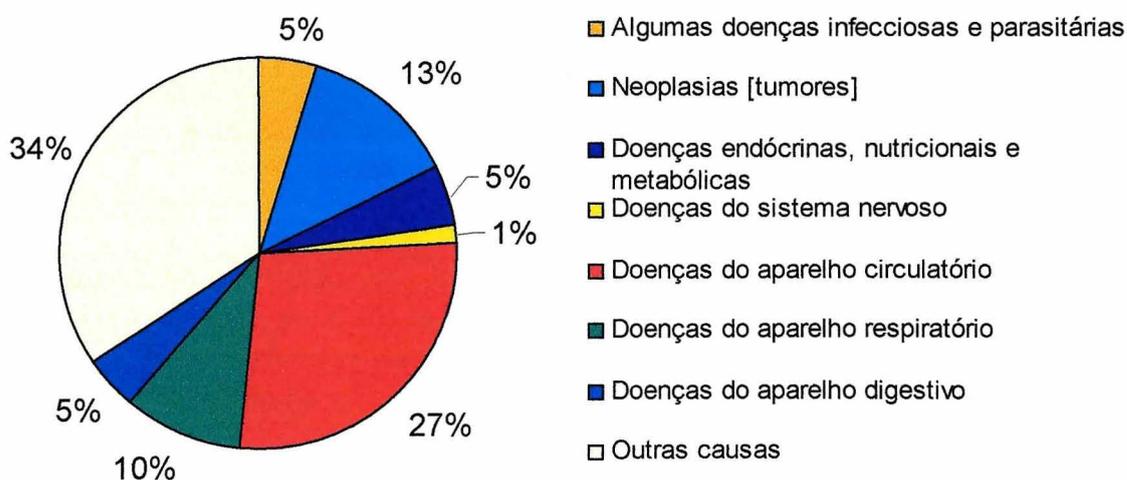


FIGURA 1 – Mortalidade no Brasil no ano de 2002 (MS/SVS/DASIS,2002)

Dentre os óbitos causados por doenças do aparelho circulatório, as doenças classificadas como hipertensivas, englobando, hipertensão essencial (primária), doença cardíaca hipertensiva, doença renal hipertensiva, doença cardíaca hipertensiva, doença cardíaca e renal

hipertensiva e hipertensão secundária, corresponde a 10% do total (**FIGURA 2**). Vale salientar que a hipertensão é a principal causa de acidente vascular cerebral, leva a doenças das artérias coronárias com infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita, e é a principal contribuinte para a insuficiência cardíaca, insuficiência renal e aneurisma dissecante da aorta.

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos no Brasil com o objetivo de avaliar a prevalência da HAS na população. No município de Catanduva, São Paulo, foi realizado um estudo da prevalência da hipertensão arterial em uma parte da população com idade superior a 18 anos. A prevalência da hipertensão arterial foi de 31,5% nos entrevistados, principalmente nos indivíduos com histórico de hipertensão, diabetes *mellitus*, com índice de massa corpórea $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ e renda familiar entre 1 a 5 salários mínimos (FREITAS *et al*, 2001).

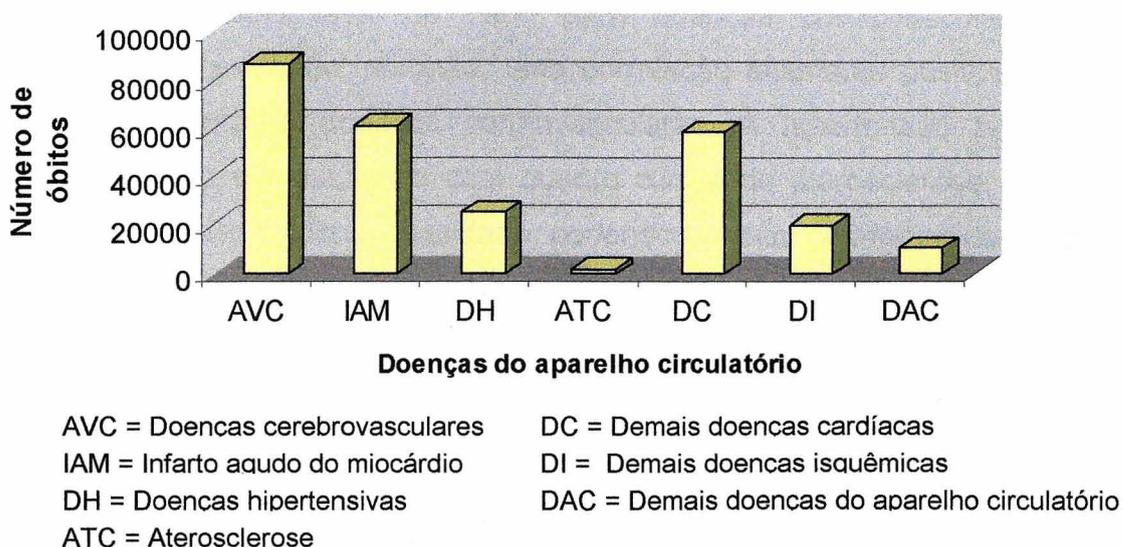


FIGURA 2 - Mortalidade no Brasil, no ano de 2002, por doenças cardiovasculares (MS/SVS/DASIS, 2002)

A prevalência da hipertensão arterial em crianças e adolescentes pode variar entre 2 a 13%, sendo obrigatória a medida anual da pressão arterial a partir dos três anos de idade. REZENDE *et al* (2003) realizaram um estudo de prevalência da hipertensão arterial no município de Barbacena, Minas

Gerais, em 607 escolares de 7 a 14 anos, observando que a prevalência da hipertensão foi de 16,6%, e os níveis tensionais aumentavam com a idade e o peso, sendo estes indicadores, portanto, muito importantes na detecção da hipertensão.

Diante dessa realidade, programas e políticas de controle da hipertensão arterial foram implantados no nosso país com o objetivo de reduzir complicações, internações e mortes relacionadas à hipertensão, aumentando o grau de conhecimento da população sobre a importância do controle da hipertensão arterial; garantindo o acesso dos hipertensos a serviços básicos de saúde, com resolubilidade e incentivando políticos e programas comunitários (MS/SPS, 2003).

2.1.2 Patogênese

O principal fator de risco para doenças cardiovasculares é a hipertensão, existindo, portanto, uma correlação altamente positiva entre a pressão arterial e doenças cardiovasculares. A hipertensão também é diagnosticada em pacientes com quadro clínico de aterosclerose, doenças renais, diabetes mellitus, obesidade, podendo também ocorrer no decorrer da gravidez (JNC 7, 2003).

A hipertensão geralmente é classificada em primária ou secundária. Os pacientes hipertensos apresentam diferentes fatores que podem levar ao aumento da pressão arterial, na maioria dos casos, a causa não é conhecida, sendo então chamada "essencial" ou hipertensão primária, sendo esta responsável por 95% de todos os casos de hipertensão. A hipertensão secundária geralmente pode resultar de doenças incluindo as doenças renais, síndrome de Cushing, hiperaldosterismo primário, hipo e hipertireoidismo ou pelo uso de anticoncepcionais (JNC 7, 2003; SBH/SBC/SBN, 2002; CARRETERO e OPARIL, 2000).

Na hipertensão, há um desequilíbrio dos vários mecanismos que, em geral, controlam a pressão arterial. Entre esses mecanismos são encontrados o sistema nervoso, especificamente a função adrenérgica e

catecolaminas, o sistema renina-angiotensina, a função excretora dos rins, incluindo o transporte do sódio e água e outras funções mediadas por outros mecanismos hormonal e de equilíbrio hidroeletrolítico (OPARIL, ZAMAN, CALHOUN, 2003; GUYTON, 1991; BRUNNER *et al.*, 1972).

O sistema nervoso é o principal responsável pelo controle, a curto prazo, da pressão arterial. Dentro de segundos, os baroreceptores e os quimiorreceptores entram em ação. Porém, no decorrer de muitas horas ou dias, os mecanismos nervosos perdem gradualmente essa capacidade, se estabelecendo um novo sistema de controle, através do sistema renal e de líquidos corporais onde, havendo excesso de líquido extracelular, a pressão arterial se eleva, fazendo com que os rins aumentem a excreção de líquido (diurese por pressão) e sódio (natriurese por pressão), normalizando a PA. Um aumento na retenção de fluídos e na reabsorção de sódio é observado quando a pressão arterial está abaixo do normal (GUYTON, 1991; GUYTON, 1990).

Além do sistema renal e de líquidos corporais, os rins possuem um outro mecanismo de controle da PA, o sistema renina-angiotensina.

Sistema Renina-Angiotensina

No paciente hipertenso é freqüentemente avaliado o sistema renina-angiotensina, no qual a atividade da renina é medida para determinar se esta enzima é um fator na patogênese da hipertensão. Esse sistema desempenha função central na regulação homeostática da pressão sanguínea e na composição eletrolítica dos líquidos corporais, tão bem como na etiologia de algumas formas de hipertensão.

A renina é uma aspartilprotease ácida sintetizada, armazenada e secretada pelas células justaglomerulares granulares dos rins, situadas nas paredes das arteríolas aferentes, em resposta a muitos fatores cardiovasculares tais como uma queda na pressão sanguínea, depleção de sódio ou uma redução no volume plasmático. O seu precursor inativo a prorenina é ativado pela ação da enzima calicreína. A renina age

hidrolisando o angiotensinogênio (entre os resíduos 10 e 11 do grupo amino terminal), uma α 2-globulina plasmática sintetizada no fígado e precursor de todas as angiotensinas, formando o decapeptídeo angiotensina I na corrente sanguínea, como apresentado na **FIGURA 3** (SKEGGS, 1964, ONDETTI e CUSHMAN, 1982; OPARIL e HABER, 1974 a,b).

Enzima Conversora da Angiotensina I

A enzima conversora da angiotensina I (ECA) desempenha uma importante função fisiológica na regulação da pressão sanguínea (**FIGURA 3**). Ela hidrolisa o decapeptídeo angiotensina I, por clivagem no C-terminal com remoção do resíduo His-Leu, no octapeptídeo biologicamente ativo, angiotensina II, um potente vasoconstritor. Ela também inativa a bradicinina, a qual possui ação vasodilatadora, pela remoção de dois peptídeos do C-terminal e estimula a liberação de aldosterona no córtex adrenal, intensificando a resistência periférica vascular (CUSHMAN e CHEUNG, 1971^b; YANG, ERDOS e LEVIN, 1970; NG e VANE, 1968; NG e VANE, 1967; SKEGGS, KAHN, SHUMWAY, 1956).

Esta enzima foi primeiramente identificada e isolada do plasma de cavalo por SKEGGS *et al.* (1956, 1954). É uma zinco metalopeptidase multifuncional que está localizada em diferentes tecidos, principalmente nas células endoteliais de capilares pulmonares e outros leitos vasculares como o coração, rins, cérebro e órgãos reprodutores. Pertence a classe das peptidases que necessitam de zinco e cloreto para a sua ativação. Como essa enzima age liberando dipeptídeos a partir da extremidade C-terminal, passou a ser referida na literatura como uma peptidildipeptídeo hidrolase ou peptidil dipeptidase (EC 3.4.15.1) (CUSHMAN e CHEUNG, 1971b).

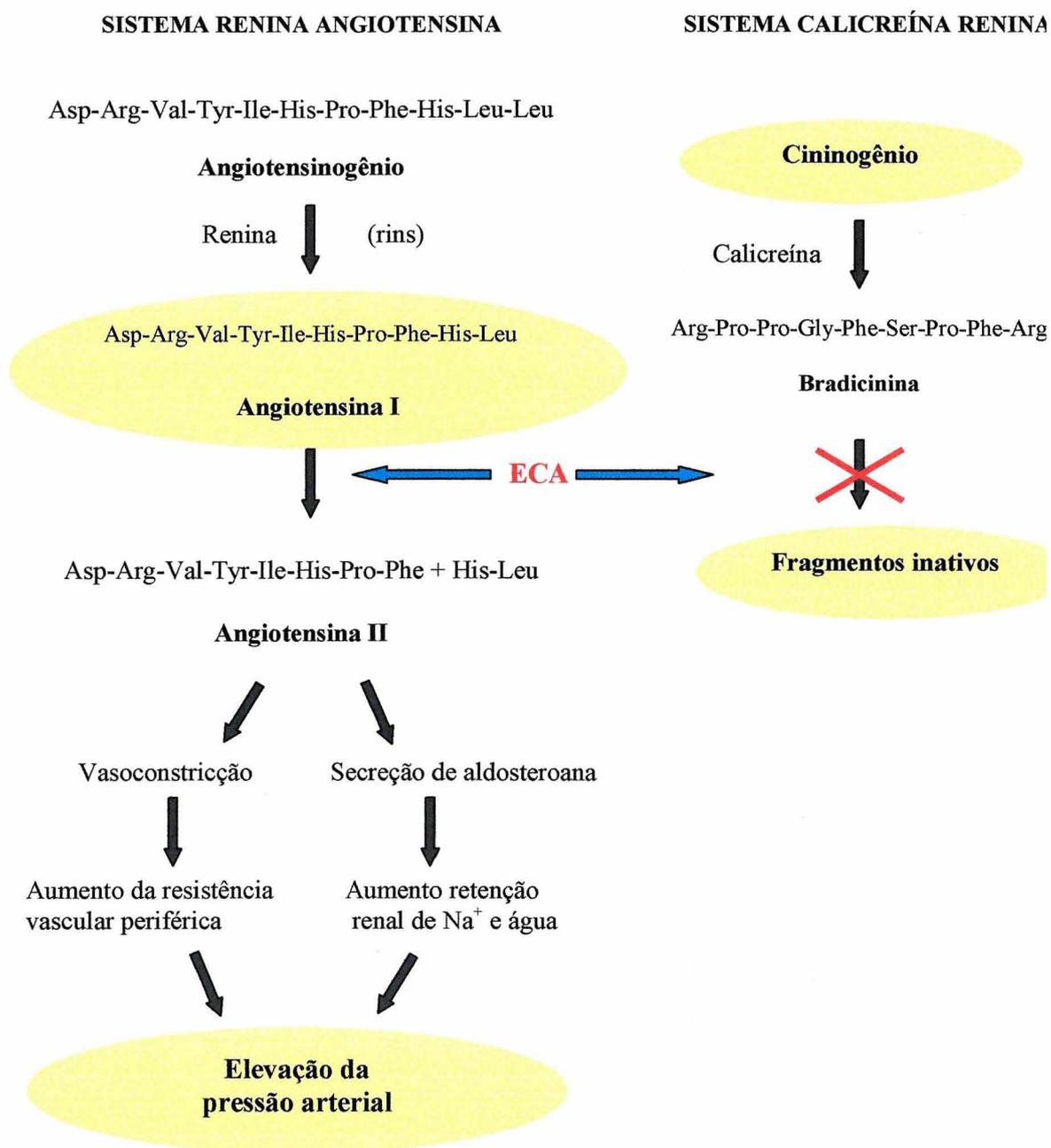


FIGURA 3 – A função da enzima conversora da angiotensina I no sistema renina-angiotensina e sua participação no sistema calicreína-renina

A atividade primária da ECA é clivar peptídeos com grupo carboxila livre. Por esse fato, sugere-se que ocorra uma interação eletrostática com um grupo catiônico da enzima, a qual exerce um papel importante na interação enzima-substrato no momento da hidrólise (ARAÚJO *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 2000).

É capaz de interagir com uma variedade de substratos hidrolisando qualquer ligação, com exceção da ligação imida de um resíduo de prolina. ROHBACH, WILLIAMS e ROLSTAD (1981), ELISSEEVA *et al.* (1971) e SCHECHTER e BERGER (1967) demonstraram que realmente substratos contendo Pro na posição P₁' e Asp ou Glu na P₂' são resistentes a ECA.

Duas isoformas da ECA são conhecidas, a somática, a qual apresenta um massa molecular entre (150 – 180kDa) e contém dois sítios ativos e a germinal ou testicular presente em células germinativas, com apenas um sítio ativo, apresentando aproximadamente 90 kDa. Recentemente, estudos do genoma humano descrevem uma terceira isoforma, a ECA homóloga ou ECA 2, a qual contém um único sítio ativo, hidrolisa a angiotensina I e II, mas não hidrolisa a bradicinina (CRACKOWER *et al.*, 2002; HUBERT *et al.*, 1991; BERNSTEIN *et al.*, 1989; SOUBRIER *et al.*, 1988; EL-DORRY *et al.*, 1982).

A ECA somática é composta de dois sítios homólogos, cataliticamente ativos, contendo cada um deles um átomo de zinco, descritos como domínio N e domínio C, referindo-se às porções N e C-terminal da molécula, respectivamente, cataliticamente independentes (WEI *et al.*, 1991; BERNSTEIN *et al.*, 1989; SOUBRIER *et al.*, 1988). Na **FIGURA 4** é representada uma parte da estrutura da ECA, a qual já foi caracterizada.

JASPARD, WEI e ALHENC-GEBAS (1993) estudando as diferenças nas propriedades e especificidade dos dois sítios ativos da ECA observaram que ambos os sítios exibem atividade catalítica similar para a angiotensina I, bradicinina e a substância P, um potente neuropeptídeo transmissor.

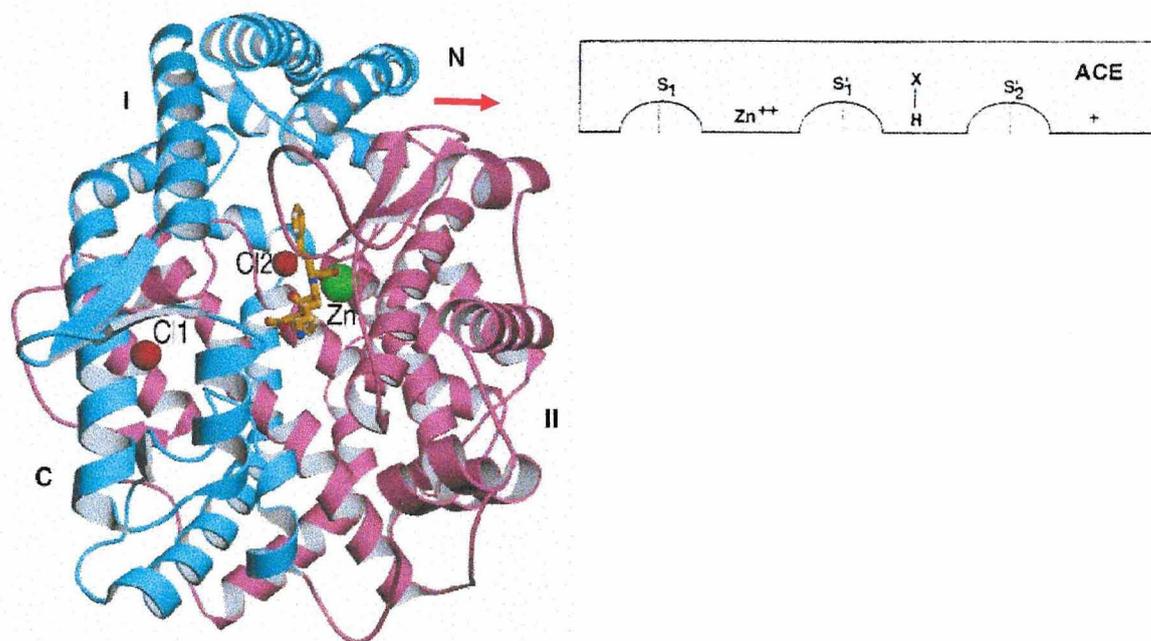


FIGURA 4 – Modelo proposto da estrutura da enzima conversora da angiotensina I (ECA).
 Fonte: <http://www.esrf.fr/UsersAndScience/Publications/Highlights/2003/MX/MX10/>

Entretanto, importantes diferenças fisiológicas entre os subsítios dos dois sítios ativos foram encontradas. O domínio C-terminal é rapidamente ativado pela presença do íon cloreto ao contrário do domínio N-terminal, o qual é ativo na ausência deste íon. Outros estudos também demonstram que o domínio C possui uma constante catalítica maior que o domínio N, quando os substratos são Hip-His-Leu e Angiotensina I e que esses dois domínios diferem na capacidade de se ligar ao inibidores competitivos da ECA. A clivagem endopeptidásica do N-terminal do substrato LH-RH, embora lenta, é preferencial para o domínio N (JASPARD, WEI e ALHENC-GEBAS, 1993; WEI *et al.*, 1992; WEI *et al.*, 1991).

Esses resultados sugerem que existem diferenças estruturais entre os dois sítios ativos e que mais estudos são necessários para verificar a função de cada um separadamente, principalmente com relação a hidrólise da bradiginina e dos outros substratos da ECA, como a angiotensina I e dos inibidores desta enzima.

Medida da atividade da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

Desde a descoberta por SKEGGS *et al.* (1956, 1954) da peptidase (ECA) que convertia o decapeptídeo angiotensina I no octapeptídeo angiotensina II, no plasma de cavalo, diversos métodos têm sido descritos na literatura para medir a atividade da ECA nos tecidos.

Ensaio radioquímicos utilizando o peptídeo angiotensina I marcado com C^{14} e técnicas de radioimunoensaio específico para angiotensina II foram utilizados para determinar a atividade da ECA, porém, os resultados obtidos pela utilização dessas metodologias não eram precisos e específicos, pois outras peptidases do tecido poderiam hidrolisar os substratos utilizados, como a angiotensina I (HOLLEMANS, DER MEER, KLOOSTERZIEL, 1969; HUGGINS e THAMPI, 1968).

Substratos específicos para a ECA, como o hipuril-histidil-leucina, foram desenvolvidos, tendo como referência a angiotensina I (substrato natural da enzima), com o objetivo de se obter métodos de análises que permitissem concluir que esta enzima seria a responsável pela clivagem e não outras peptidases presentes no tecido.

Após ensaios prévios utilizando o substrato hipuril-histidil-leucina (HHL), um tripeptídeo protegido no grupo N-terminal, a ECA purificada de pulmão de cachorro e ninidrina para detecção do dipeptídeo histidil-leucina liberado, CUSHMAN e CHEUNG, em 1971, descreveram um ensaio espectrofotométrico, "in vitro", baseado na formação do ácido hipúrico a partir do substrato sintético hipuril-histidil-leucina (HHL) pela ECA purificada de pulmão de coelho (**FIGURA 5**).

Os autores observaram que neste ensaio, o HHL é específico para ECA, em diferentes concentrações enzimáticas, enquanto outras carboxipeptidases que poderiam clivar esse substrato estão presentes apenas em concentrações insignificantes nos extratos enzimáticos obtidos dos pulmões. Esta metodologia passou a ser a mais utilizada para determinar a atividade "in vitro" da ECA.

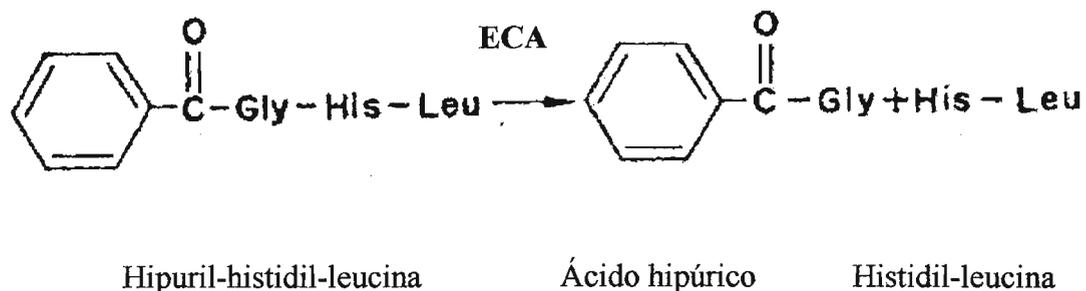


FIGURA 5 – Conversão do hipuril-histidil-leucina pela ECA em ácido hipúrico (CUSHMAN e CHEUNG, 1971)

Os fatores condicionantes para este ensaio foram determinados. Para a análise, em um tubo de ensaio contendo 0,25mL de uma solução de tampão fosfato de potássio, 100mM, cloreto de sódio, 300mM e substrato HHL, 5mM, adiciona-se 0,15mL de uma solução contendo a ECA (0-10mU), iniciando-se a reação. Os tubos são incubados a 37°C, por 30 minutos, sob agitação constante. Para parar a reação enzimática adiciona-se 0,25mL de HCl 1N. O ácido hipúrico liberado pela ação da ECA sobre o HHL é extraído da solução acidificada com 1,5mL de acetato de etila. Após agitação no vortex, por 15 segundos, seguida de centrifugação, uma alíquota de 1,0mL da camada de acetato de etila é evaporada por aquecimento a 120°C, por 30 minutos. O ácido hipúrico é redissolvido com 1mL de água e a absorbância é lida em 228m μ em espectrofotômetro.

Porém, esse método apresentava uma grande desvantagem, quando utilizado para determinar a atividade da ECA em sistemas biológicos: altas concentrações de lipídeos interferiam com a extração e subsequente solubilização do produto formado, o ácido hipúrico (FRIEDLAND e SILVERSTEIN, 1976). Além disso, possui um tempo de reação longo com um maior número de etapas.

Modificações do método de Cushman e Cheung foram desenvolvidos baseados no monitoramento da produção do ácido hipúrico a partir do substrato Hip-His-Leu.

Ensaio fluorimétrico foram desenvolvidos inicialmente utilizando substratos com benziloxycarbonila-Phe-His-Leu ou benziloxycarbonila-Pro-Phe-His-Leu (ROTH, WEITZMAN e PIQUILLOUD, 1969). FRIEDLAND e SILVERSTEIN (1976) descreveram um método fluorimétrico baseado na formação de um aduto fluorescente entre o o-fitaldialdeído e o His do produto His-Leu formado a partir do substrato Hip-His-Leu. É um método rápido, sensível, sem muitos passos, podendo ser aplicado quando se tem baixas concentrações de amostras, porém é de pouca precisão.

Pesquisadores tem procurado desenvolver metodologias mais simples, sensíveis, com um tempo de reação curto e de baixo custo. Substratos com apagamento intramolecular de fluorescência foram desenvolvidos para tornar mais sensível e rápida a determinação de enzimas proteolíticas, procurando assim, facilitar o acompanhamento da atividade enzimática e dos estudos de cinética. ARAÚJO (2000) descreveu um método que se baseia na hidrólise de peptídeos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência do tipo Abz-peptidil-K (Dnp)-X-OH pela ECA. Esse método se baseia na hidrólise do peptídeo sintético do tipo Abz-peptidil-K(Dnp)-X-OH pela ECA, o qual contém um grupo fluorescente Abz (ácido orto-amino benzóico), ligado ao grupo N-terminal do peptídeo e ao grupo apagador Dnp (2,4-dinitrofenil) incorporado ao ϵ -amino grupo de um aminoácido da cadeia peptídica (**FIGURA 6**).

Após a hidrólise, ocorre a liberação da fração Abz-peptidil responsável pela fluorescência, a qual pode ser detectada continuamente em um fluorímetro. Os peptídeos do tipo Abz-YRK (Dnp)-P-OH e Abz-FRK (Dnp)-P-OH mostraram ser excelentes substratos para ECA com valores de K_m de 5,1 e 4,0 μM , respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2000).

A facilidade deste ensaio está na possibilidade do monitoramento da velocidade de hidrólise direto na cubeta do fluorímetro, permitindo detectar a enzima de forma rápida e contínua, mesmo quando ela está presente em baixas concentrações.

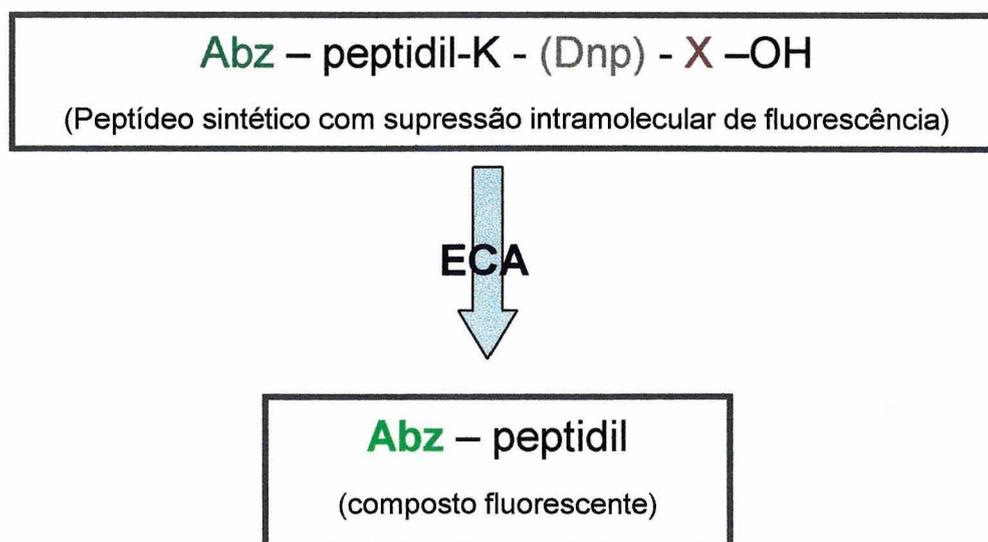


FIGURA 6 - Hidrólise do peptídeo sintético do tipo Abz-peptidil-K(Dnp)-X-OH pela ECA (ARAÚJO *et al.*, 2000)

2.1.3 Tratamento

Com o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade de doenças cardiovasculares, causadas pelos altos níveis tensionais e outros fatores agravantes como hábito de fumar e beber, consumo alimentar inadequado e falta de atividade física do paciente hipertenso, várias estratégias terapêuticas têm sido estudadas.

Dois tipos de tratamento são aplicados para a regulação da pressão arterial. O primeiro se baseia em mudanças no estilo de vida, utilizando para tanto medidas não medicamentosas e o segundo tipo é o tratamento medicamentoso, o qual associa mudanças no estilo de vida a fármacos anti-hipertensivos.

Os tratamentos indicados nos casos de hipertensão arterial já foram comprovados que são efetivos, porém a manutenção da pressão arterial dentro dos níveis desejáveis ainda é insatisfatória. Isso se deve em grande parte à falta de adesão ao tratamento. Estudos isolados têm apontado que a falta de controle da hipertensão gira em torno de 30 a 40%, podendo chegar

ao grau mais elevado, ou seja, ao abandono do tratamento, com índice de 56% (BUSNELLO *et al.*, 2001).

ANDRADE *et al.* (2002) analisaram as razões apresentadas pelos pacientes para interromper o tratamento farmacológico e constataram que dos 401 pacientes, 41,8% paravam com o tratamento após constatar uma normalização da pressão, 28,25% devido aos efeitos colaterais da medicação, 22,7% simplesmente esqueciam de tomar o medicamento, 20,9% achavam o custo dos medicamentos muito elevado, 26% desconheciam a necessidade de continuar o tratamento, 11% tinham medo de se intoxicar, 11%, medo de hipotensão e 7,3% tinham medo de misturar o medicamento antihipertensivo com outras drogas.

Não importa o tipo de tratamento que será escolhido, farmacológico ou não, o fundamental é obter a adesão continuada dos pacientes às medidas recomendadas para a obtenção de um controle adequado da pressão arterial. A adesão dos pacientes é determinante no sucesso do tratamento.

Tratamento medicamentoso

Agentes anti-hipertensivos utilizados no tratamento da hipertensão devem promover a redução dos níveis tensionais e de eventos cardiovasculares. Esses medicamentos podem ser divididos em seis grupos, apresentados na **TABELA 3**. Convém lembrar que a maioria dos estudos realizados com esses medicamentos para o controle da hipertensão nos estágios 1 e 2 sugerem uma combinação de todos esses fármacos (SBH/SBC/SBN, 2002).

Como a ECA está envolvida na regulação da pressão arterial e atua indiretamente no metabolismo hidroeletrolítico, ela tem sido muito estudada com o objetivo de se encontrar inibidores que possam ser utilizados no tratamento da hipertensão arterial.

Inibidores potentes e específicos da enzima conversora (**TABELA 4**) comercialmente disponíveis são utilizados como um dos principais agentes

bloqueadores do sistema renina-angiotensina, atuando com sucesso, no tratamento da hipertensão arterial.

TABELA 3 – Classes de antihipertensivos e seus mecanismos de ação no controle da pressão arterial

Anti-hipertensivos	Mecanismo de ação
<i>Diuréticos</i>	Depleção de volume seguido da redução da resistência vascular periférica decorrente de mecanismos diversos
<i>Inibidores adrenérgicos</i> Ação central	Estimulam os receptores alfa-2-adrenérgicos pré-sinápticos, reduzindo o tônus simpático
Alfa-1-bloqueadores Betabloqueadores	Diminuição inicial do débito cardíaco, redução da secreção de renina, readaptação dos baroreceptores, diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas
<i>Vasodilatadores diretos</i>	Relaxamento muscular com conseqüente vasodilatação e redução da resistência vascular periférica
<i>Inibidores da Enzima conversora da angiotensina I (ECA)</i>	Inibição da ECA, bloqueando a transformação da angiotensina I em II no sangue e nos tecidos
<i>Bloqueadores dos canais de Cálcio</i>	Redução da resistência vascular periférica por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares
<i>Anatagonistas do receptor At1 da angiotensina II</i>	Antagonizam a ação da angiotensina II por meio do bloqueio específico de seus receptores

Adaptado e modificado de SBH/SBC/SBN, 2002

O captopril (2-D-metil-3-mercaptopropanoil – L- prolina) foi o primeiro inibidor específico da ECA descrito na literatura no final do período de 1970, por ONDETTI, RUBIN e CUSHMAN (1977). É um potente inibidor da Eca com K_i de 1,7nM. Acompanhando a utilização clínica desse fármaco pelos pacientes, observou-se a presença de efeitos colaterais atribuídos ao grupo SH presente em sua molécula. Portanto, iniciou-se a procura de novos inibidores que não apresentassem o grupo SH, sendo os mais conhecidos o enalapril e o lisinopril (PATCHETT *et al.*, 1980; BIOLLAZ *et al.*, 1981).

TABELA 4 – Agentes antihipertensivos, inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA), disponíveis comercialmente no Brasil

Inibidores da ECA	Posologia (mg)		Frequência diária
	Mínimo	Máximo	
Benazepril (Lotensin)	5	20	1-2
Captopril (Capoten)	25	150	2-3
Cilazapril	2,5	5	1-2
Delapril	15	30	1-2
Enalapril (Vasotec)	5	40	1-2
Fosinopril (Monopril)	10	20	1-2
Lisinopril (Privilil, Zestril)	5	20	1-2
Quinapril (Accupril)	10	20	1
Perindopril (Aceon)	4	8	1
Ramipril (Altace)	2,5	10	1-2
Trandolapril (Mavik)	2	4	1

Adaptado e modificado de SBH/SBC/SBN, 2002.

Os inibidores da Eca podem ser classificados em três amplos grupos com base em sua estrutura química: (1) inibidores da ECA contendo sulfidril estruturalmente relacionado com o captopril; (2) inibidores da ECA contendo dicarboxil com estrutura relacionada ao enalapril e (3) inibidores da ECA contendo fósforo com estrutura relacionada ao fosinopril. A estrutura desses grupos de inibidores está apresentada na **FIGURA 7**.

Com a descoberta dos dois sítios ativos da ECA, outros inibidores da enzima foram estudados, tendo como interesse obter inibidores específicos para cada domínio. Wei *et al* (1992) demonstraram que os dois domínios são sítios ativos de alta afinidade para os inibidores captopril, enalapril e lisinpril, com valores de K_i da ordem nanomolar. Recentemente foram descritos inibidores para cada um dos sítios ativos, o RXP407, inibidor do domínio N (DIVE *et al.*, 1999) e o RXPA380, inibidor do domínio C (GEORGIADIS *et al.*, 2003).

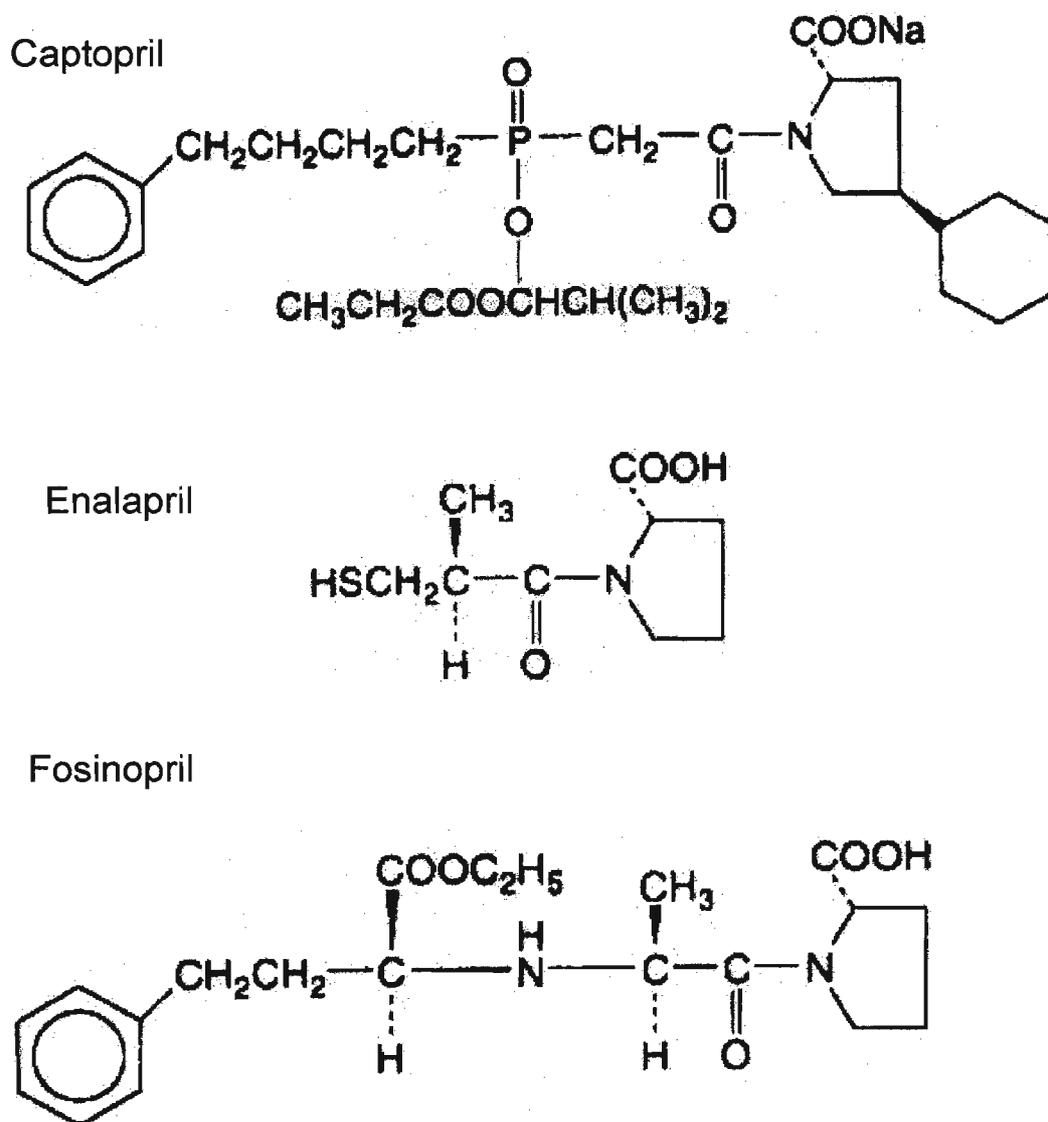


FIGURA 7 – Estrutura química dos inibidores captopril, enalapril e fosinopril

Esses inibidores são comercializados e utilizados rotineiramente no combate à hipertensão arterial e na insuficiência cardíaca. Porém, como todos os medicamentos utilizados no tratamento da hipertensão, os inibidores da ECA também apresentam alguns efeitos colaterais, destacando-se a ocorrência de tosse seca, alteração do paladar, hiperpotassemia, aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina (todavia, quando administrados a longo prazo foi observado um efeito nefroprotetor) e mais raramente, reações de hipersensibilidade com erupção cutânea. São contra-indicados na gravidez e em adolescentes, o emprego desses

medicamentos deve ser cauteloso (SBH/SBC/SBN, 2002; ATKINSON & ROBERTSON, 1979).

A dose desses medicamentos deve ser ajustada até que se consiga redução da pressão arterial a um nível considerado satisfatório para cada paciente e deve ser feita, buscando a menor dose eficaz, ou até que surjam efeitos adversos.

Tratamento não-medicamentoso

Alterações no estilo de vida, como redução do consumo de bebidas alcoólicas, abandono do tabagismo, exercício físico e correção do hábito alimentar como uso moderado de sal e consumo adequado de potássio, são essenciais na redução do risco da hipertensão, sendo indispensáveis para o tratamento de pacientes hipertensos (SBH/SBC/SBN, 2002).

A conduta estabelecida para pacientes com hipertensão arterial deve consistir:

a) no controle do peso corporal - o excesso de peso é um fator predisponente para a hipertensão. Índice de massa corporal (IMC) inferior a 25 kg/m² e circunferência da cintura inferior a 102 cm para homens e 88 cm para mulheres são metas a serem alcançadas pelos pacientes com excesso de peso, onde uma redução de 5 a 10% do peso corporal inicial já é capaz de proporcionar redução da pressão arterial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997);

b) na redução da quantidade de sal na elaboração das refeições – efeitos benéficos aos pacientes hipertensos têm sido encontrados, quando se restringe o sal da dieta, como menor prevalência de complicações cardiovasculares, redução da pressão arterial e menor incremento da pressão arterial com o envelhecimento. Uma dieta de aproximadamente 6,7g /dia (1 colher de chá) por 28 dias reduz 3,9mmhg na pressão sistólica e 1,9mmhg na diastólica (KAPLAN, 2000; ROSE, 1990);

c) na limitação ou abolição do uso de bebidas alcólicas e abandono do tabagismo (SBH/SBC/SBN, 2002);

d) na prática de atividade física - além de diminuir a pressão arterial, o exercício físico reduz consideravelmente o risco de doença arterial coronariana, de acidente vascular cerebral e mortalidade. Recomenda-se a frequência de 3 a 6 vezes por semana, intensidade moderada e sessões de 30 a 60 minutos de duração (BERLIM e COLDITZ, 1990; PAFFENBARGER, 1988).

Como mencionado anteriormente, alguns inibidores da ECA, como captopril, enalapril e lisinopril, são utilizados como medicamentos para o tratamento da hipertensão. Por outro lado, podemos observar que os alimentos exercem diferentes respostas sobre a pressão arterial, sugerindo que seja dada uma maior atenção aos componentes que estes contêm. Sendo assim, peptídeos inibidores da enzima ECA, derivados de proteínas alimentares, poderiam ser consumidos durante a alimentação, mantendo os níveis da pressão arterial normais, prevenindo o risco de hipertensão arterial.

2.2 Peptídeos biologicamente ativos

Um grande número de peptídeos biologicamente ativos têm sido isolados de bactérias, fungos, plantas e de produtos animais. Podem estar presentes originalmente nos alimentos, mas também podem ser liberados durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal ou apresentarem-se em hidrolisados protéicos "in vitro". A estrutura desses peptídeos foi descrita como sendo de simples dipeptídeos até estruturas complexas lineares ou cíclicas (GILL *et al.*, 1996).

Os peptídeos bioativos foram primeiramente mencionados por MELLANDER, em 1950, quando ele observou que os peptídeos fosforilados derivados de caseína aumentaram a calcificação óssea, independentemente da vitamina D, em crianças raquíticas. A partir daí, numerosas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de separar e caracterizar esses peptídeos, como podemos observar no **QUADRO 1** (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001).

QUADRO 1 – Identificação dos peptídeos bioativos derivados das proteínas do leite, adaptado de PIHLANTO-LEPPÄLÄ (2001)

Peptídeos bioativos	Proteína precursora	Bioatividade
Fosfopeptídeos	α - e β - Caseína	Carreador de minerais
Casomorfina	β -Caseína	Agonista opióide
α -caseína exorfina	α -Caseína	Agonista opióide
Imunopeptídeos	α - e β - Caseína	Imunoestimulatório
Casocininas	α - e β - Caseína	Inibidor da ECA
Casoxinas	κ -Caseína	Antagonista opióide
Lactorfinas	α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina	Agonista opióide
Casoplatelinas	κ -Caseína	Antitrombose
Lactoferricina	Lactoferrina	Antimicrobiano
Lactocininas	α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina	Inibidor da ECA

A perspectiva de utilização desses peptídeos naturais ou sintéticos têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, e acredita-se em uma grande aplicação tanto na indústria de alimentos, como na farmacêutica.

Diversas fontes protéicas podem ser utilizadas para obtenção desses peptídeos bioativos, tais como o leite, o músculo do peixe, ovos (lisozima), soja, geléia real, milho, gelatina, glúten, plasma bovino, entre outras (MATSUI *et al.*, 2002; HYUN & SHIN, 2000; MAENO, YAMAMOTO, TAKANO, 1996; KINOSHITA, YAMAKOSHI, KIKUCHI, 1993; KOHAMA *et al.*, 1991).

A procura por peptídeos com atividade biológica atingiu o seu ápice na década de 80 e até hoje diversos estudos são realizados, demonstrando que estes peptídeos podem desempenhar várias funções, principalmente atuando como antibióticos, hormônios, agentes antivirais e antibacterianos, antioxidantes, além do mais, regulando ou inibindo a atividade enzimática, como apresentado, resumidamente, no **QUADRO 2**.

Certos peptídeos bioativos, como os derivados do leite, podem ainda revelar atividades multifuncionais, como por exemplo, a β -casomorfina-7 que

pode exercer a ação de um opióide, inibir a enzima ECA ou ainda, atuar como um imunomodulador (BRANTL *et al.*, 1981).

QUADRO 2 – Exemplos de peptídeos biologicamente ativos

Classe dos Peptídeos	Resíduos	Atividade
<u>Antibióticos</u>		
Lactoferrina	25	Bactericida
<u>Neuropeptídeos</u>		
α -Endorfina	16	Neuromodulador
<u>Hormonais</u>		
Vasopressina	9	Contração do músculo vascular
<u>Enzimas reguladoras e inibidoras</u>		
Glutationa	3	Regulador de cofator

Adaptado e modificado de GILL *et al.*, 1996

AMAROWICZ & SHAHIDI (1997) encontraram peptídeos com atividade antioxidante em frações protéicas isoladas de hidrolisados protéicos de “capelin”. Peptídeos imunoativos, com forte atividade estimulante dos leucócitos foram obtidos nas frações peptídicas ácidas de hidrolisados protéicos de salmão por GILDBERG *et al.* (1996).

Dando continuidade às pesquisas com peptídeos exibindo diferentes atividades biológicas, concluiu-se que a atividade geralmente é atribuída a uma seqüência específica de aminoácidos, contendo 3 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula, liberados após um processo de hidrólise (PIHLANTO-LEPPÄLLÄ, 2001; GILL *et al.*, 1996). Apesar da relação estrutura x atividade de muitos peptídeos bioativos ainda não ter sido completamente estabelecida, muitos peptídeos apresentam características estruturais em comum.

Dentre as fontes protéicas mais estudadas, tanto de origem vegetal ou animal, as proteínas do leite apresentam-se como a maior fonte de peptídeos bioativos, especialmente a caseína, as quais são precursoras de diferentes peptídeos biologicamente ativos. Analisando-se estruturalmente as principais

proteínas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, observa-se seqüências bioativas de aminoácidos. Esses peptídeos estão inativos quando fazem parte da cadeia protéica, porém, tornam-se ativos quando liberados pela hidrólise protéica; podendo desempenhar, então, funções diversas, como moduladores de vários processos corporais (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., 2001; MEISEL, 1997).

Durante a hidrólise das proteínas do leite, peixe, soja e cereais, uma variedade de peptídeos com atividade opióide são formados. Esses peptídeos são fundamentais para o funcionamento do sistema nervoso, assim como pela regulação da percepção da dor (MEISEL & SCHLIMME, 1990).

Os compostos endógenos, como encefalinas, endorfinas, e dinorfinas e outros compostos neuroativos como a somatostatina, a bradiginina e o hormônio liberador da tireotrofina, são exemplos de peptídeos típicos com atividade opióide (peptídeos neuroativos) possuindo características estruturais similares. A presença do aminoácido tirosina, no resíduo amino terminal e a presença de outro aminoácido aromático, como a fenilalanina e tirosina, na terceira ou quarta posição, a partir da extremidade N-terminal, (**Tyr-Gly-Gly-Phe**) caracteriza os peptídeos opióides típicos. A carga negativa, característica do grupo hidroxila do anel fenólico da tirosina, parece ser essencial para a atividade opióide, de modo que, a falta do resíduo de tirosina resulta na ausência da bioatividade. A presença de um outro aminoácido aromático na terceira ou quarta posição também parece contribuir com a atividade opióide. Os peptídeos com atividade opióide derivados de proteínas alimentares são considerados opióides atípicos, pois apesar de conservar na sua estrutura a Tyr no grupo N-terminal, podem apresentar outros resíduos de aminoácidos na seqüência restante, como Tyr-X-Phe ou Tyr-X₁-X₂-Phe (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001; HOLLT, 1983; CHANG *et al.*, 1981).

Esses dados mostram que existe uma relação estrutura x atividade para a funcionalidade biológica dos peptídeos e que mais estudos nessa área são necessários.

2.2.1 Peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

FERREIRA (1965) foi o primeiro a isolar do veneno da cobra brasileira (*Bothrops jararaca*) pequenos peptídeos que exibiam uma forte atividade inibidora para a enzima ECA, os quais foram denominados de fatores potenciadores da bradicinina. Cinco anos após a sua descoberta, a sequência de aminoácidos de sete peptídeos inibidores foram determinadas por FERREIRA *et al.* (1970) e ONDETTI *et al.* (1971) e estão apresentadas no QUADRO 3. Os peptídeos contêm 5 a 13 resíduos de aminoácidos por molécula e possuem a sequência Ala-Pro ou Pro-Pro no grupo C-terminal.

QUADRO 3 – Estrutura dos primeiros peptídeos inibidores da ECA isolados do veneno da cobra brasileira *Bothrops jararaca*

Nomenclatura*	Estrutura
BPP 5a SQ20475	Pyr-Lys-Trp-Ala-Pro
BPP 9a SQ20881	Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro
BPP 10b SQ20861	Pyr-Asn-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro
BPP 11d SQ20661	Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Thr-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro
BPP 10c SQ20858	Pyr-Asn-Trp-Pro-His-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro
BPP 13a SQ20718	Pyr-Gly-Gly-Trp-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro
BPP 10a SQ20859	Pyr-Ser-Trp-Pro-Gly-Pro-Asn-Ile-Pro-Pro

* Nomenclatura foi designada por pesquisadores que trabalhavam com peptídeos naturais e sintéticos. Pyr = pyrrolodonecarboxyl. Adaptado de CHEUNG e CUSHMAN, 1973.

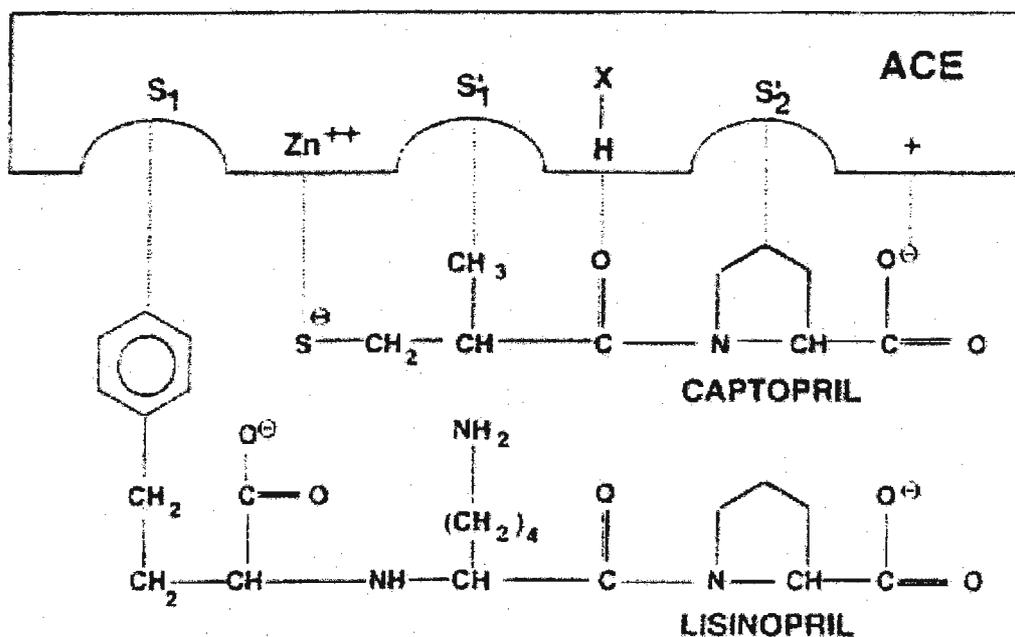
Esses peptídeos foram sintetizados (idênticos aos encontrados no veneno da *Bothrops jararaca*) e utilizados para estudar a inibição da ECA.

CHEUNG e CUSHMAN (1972) estudando a inibição da ECA por esses peptídeos concluíram que a inibição é do tipo competitiva e que os inibidores se ligam à enzima da mesma maneira que esta se liga ao substrato. Eles enfatizam, também, a importância dos três últimos resíduos de aminoácidos no grupo C-terminal, tanto para os substratos quanto para os inibidores. Com relação aos peptídeos inibidores, os pesquisadores observaram que todos apresentam um resíduo de prolina na penúltima posição da molécula no grupo C-terminal, exceto o SQ 20 475. A prolina, então seria a responsável pela característica de inibidor e não de substrato dos peptídeos.

O peptídeo SQ 20 475, que apresenta um resíduo de prolina no final da seqüência de aminoácidos do C-terminal, contribuiu com a inibição, porém, esta foi de curta duração. Os autores, além de destacarem a importância dos três últimos resíduos de aminoácidos do grupo C-terminal para a ligação do peptídeo com a ECA, eles chamam atenção para a importância dos outros resíduos de aminoácidos da estrutura do peptídeo pela maior ou menor afinidade total com a estrutura da enzima.

Desde a descoberta desses peptídeos inibidores da ECA no veneno de cobra, muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de encontrar medicamentos para serem utilizados no controle da pressão arterial.

ONDETTI e CUSHMAN, em 1982, revisaram o modelo hipotético de interação entre a ECA e seus substratos ou inibidores competitivos propostos por ONDETTI *et al.* (1977), cuja estrutura pode ser observada na **FIGURA 8**. Vários inibidores potentes da ECA têm sido desenvolvidos com base nesse modelo, como o captopril.



Natural substrate



FIGURA 8 – Modelo hipotético de interação entre a ECA e seus substratos proposto por ONDETTI *et al.* (1977)

2.2.2 Peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA) obtidos de proteínas alimentares

Peptídeos obtidos de proteínas alimentares com a mesma atividade biológica, foram primeiramente descrito por OSHIMA *et al.* (1979), utilizando a gelatina como fonte protéica. Além da gelatina, muitas outras fontes foram utilizadas e os peptídeos resultantes foram estudados com relação à atividade inibidora da ECA. O QUADRO 4 ilustra alguns desses peptídeos. Observa-se uma grande variedade de peptídeos com essa atividade biológica com diferentes estruturas moleculares (sequência de aminoácidos), obtidos pela hidrólise de diferentes fontes protéicas, como a carne de frango e de suíno, leite e algumas fontes de origem vegetal, como a soja, alho e algas.

QUADRO 4 – Peptídeos inibidores da ECA obtidos de diferentes fontes de proteínas alimentares

Estrutura	Fonte	Obtenção	Referência
IY	Algas	Calor	Suetsuna <i>et al.</i> , 2004
GFXGTXLX GF	Peito de frango	Protease de <i>Aspergillus</i>	Saiga <i>et al.</i> , 2003
NG	Soja	Alcalase 2,4 L	Wu & Ding, 2002
NLP	Soja	Alcalase 2,4 L	Wu & Ding, 2002
IF	Geleia real	Pepsina/ quimotripsina/ tripsina	Matsui <i>et al.</i> , 2002
MNP	Suínos	termolisina	Arihara <i>et al.</i> , 2001
VIEKYP	Cogumelos	álcoolico	Choi <i>et al.</i> , 2001
FY	Alho	Álcoolica	Suetsuna, 1998
ALPMHIR	β -lactoalbumina	tripsina	Mullaly <i>et al.</i> , 1997
YGLF	α -lactoalbumina	síntese	Mullaly <i>et al.</i> , 1996
YIPIQYVLSR	κ -caseína	tripsina	Yoshikawa <i>et al.</i> , 1992
LSP	α -zeína	termolisina	Miyoshi <i>et al.</i> , 1991
TTMPLW	α s1-Caseína	tripsina	Maruyama <i>et al.</i> , 1987
PLW	α s1-Caseína	síntese	Maruyama <i>et al.</i> , 1987

Em um hidrolisado protéico de zeína, um tripeptídeo contendo um resíduo de prolina no C-terminal (Leu-Arg-Pro), exibiu uma forte atividade inibitória da ECA (MIYOSHI *et al.*, 1991). YOKOYAMA *et al.* (1992) realizaram ensaios com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) administrando o tripeptídeo Ile-Lys-Pro a estes animais, sendo observada uma diminuição da pressão arterial sistólica.

A purificação de um hidrolisado de caseína, obtido pela ação de uma proteinase de *Lactobacillus helveticus* CP 790, resultou em dez peptídeos, os quais apresentaram atividade anti-hipertensiva quando administrados oralmente a animais SHR. Dos peptídeos com atividade anti-hipertensiva, o peptídeo de sequência Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln apresentou atividade inibitória de maior duração, entre 2 a 10 horas depois da administração de 2mg/kg de peptídeo por peso corporal. O efeito máximo foi observado seis horas após a administração (MAENO, YAMAMOTO e TAKANO, 1996).

Além de participar da modulação da pressão sangüínea, os peptídeos inibidores da ECA podem estar envolvidos em outros sistemas reguladores

do organismo, como na regulação dos sistemas imune e nervoso ou podem atuar como antioxidantes (MEISEL, 1998; HOU, CHENG e LIN, ANO).

O pescado tem apresentado excelente fonte de peptídeos inibidores da ECA, como pode ser observado no **QUADRO 5**. Os peixes mais estudados para a obtenção de peptídeos com essa atividade biológica foram a sardinha, o atum e o bonito. Diversos processos de hidrólise foram estudados, principalmente com relação à enzima.

Quadro 5 – Peptídeos do pescado com atividade inibitória da ECA

Peptídeo	Peixe	Preparação	IC ₅₀	Referência
IKP	Músculo de bonito	Síntese	0,61 µM	Yokoyama <i>et al.</i> , 1992
IY	Músculo de bonito	termolisina	3,7 µM	Yokoyama <i>et al.</i> , 1992
IWHHT	Músculo de bonito	termolisina	5,1 µM	Yokoyama <i>et al.</i> , 1992
IVGRPRHQG	Músculo de bonito	termolisina	6,2 µM	Yokoyama <i>et al.</i> , 1992
KW	Músculo de sardinha	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,63 µM	Matsufuji <i>et al.</i> , 1994
AKK	Músculo de sardinha	<i>Bacillus licheniformis</i>	3,13 µM	Matsufuji <i>et al.</i> , 1994
GWAP	Músculo de sardinha	<i>Bacillus licheniformis</i>	3,86 µM	Matsufuji <i>et al.</i> , 1994
IY	Músculo de sardinha	<i>Bacillus licheniformis</i>	10,5 µM	Matsufuji <i>et al.</i> , 1994
LRP	Músculo de bonito	autólise	1,0 µM	Matsumura <i>et al.</i> , 1993
LRP	Músculo de bonito	autólise	1,8 µM	Matsumura <i>et al.</i> , 1993
VRP	Músculo de bonito	autólise	2,2 µM	Matsumura <i>et al.</i> , 1993
IKP	Músculo de bonito	autólise	2,5 µM	Matsumura <i>et al.</i> , 1993
PTHIKWGD	Músculo de atum	autólise	0,9 µM	Kohama <i>et al.</i> , 1991
PTHIKW	Músculo de atum	autólise	1,8 µM	Kohama <i>et al.</i> , 1991
PTHIKWG	Músculo de atum	autólise	7,6 µM	Kohama <i>et al.</i> , 1991
YALPHA	Fígado e músculo Lula	autólise	9,8 µM	Wako, Ishikawa, Muramoto, 1996
CWLPVY	Músculo de atum	pepsina	22,20 µM	Astawan <i>et al.</i> , 1995
GPL	Pele bacalhau	Alcalase + pronase E	2,65 µM	Byun & Kim, 2001

A estrutura versus atividade biológica dos peptídeos inibidores da ECA, obtidos das proteínas alimentares, ainda não está totalmente elucidada. Contudo os peptídeos apresentam algumas características em comum. A relação entre estes peptídeos indica que a ligação com os subsítios S₁, S₁' e S₂' do sítio ativo da ECA é fortemente influenciada pela sequência dos três últimos aminoácidos localizados no grupo carboxila

terminal. A ECA parece preferir substratos ou inibidores competitivos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada), no grupo C-terminal, os quais podem interagir com os subsítios da ECA e aminoácidos de cadeia alifática no grupo N-terminal. Esses peptídeos frequentemente contêm resíduos de prolina no grupo carboxila terminal (KOHAMA et al., 1991; ONDETTI & CUSHMAN, 1982; CHEUNG *et al.*, 1980).

Com esses dados, podemos observar que as características dos peptídeos inibidores da ECA obtidos pela hidrólise das proteínas alimentares são similares aos peptídeos inibidores da ECA encontrados no veneno da cobra.

2.2.3 Medida da atividade inibidora da ECA pelos peptídeos

O método descrito por CUSHMAN & CHEUNG foi adaptado para verificar a ação de possíveis inibidores desta enzima. Durante a hidrólise do HHL pela ECA, os peptídeos com atividade inibidora da ECA são adicionados a essa reação e a atividade inibitória é expressa em percentual ou como valor IC_{50} (inhibitory concentration 50%), correspondendo à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50% (MATSUI, MATSUFUJI & OSAJIMA, 1992; FRIEDLAND & SILVERSTEIN, 1976; CUSHMAN & CHEUNG, 1971^a).

É o mais utilizado na literatura, porém, como já descrito anteriormente é um método que possui um tempo de reação longo, com um maior número de etapas.

O método descrito por Araújo (2000) para medir a atividade da ECA, utilizando substratos com apagamento intramolecular de fluorescência, se apresenta como um método com tempo de reação curto, sensível, sem muitos passos com relação ao descrito por CUSHMAN & CHEUNG (1971^a).

Esse método, o qual se baseia na hidrólise de peptídeos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência do tipo Abz-peptidil-K (Dnp)-

X-OH pela ECA, pode ser adaptado para o ensaio da atividade inibidora dos peptídeos obtidos pela hidrólise de proteínas alimentares.

Após a hidrólise do Abz-peptidil-K (Dnp)-X-OH, ocorre a liberação da fração Abz-peptidil responsável pela fluorescência, a qual pode ser detectada continuamente em um fluorímetro. Ao adicionar o peptídeo com atividade inibidora, pode ser medida a redução da atividade enzimática pela adição do inibidor, determinando-se o valor de IC_{50} , ou seja, a concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50% na solução. Essa metodologia foi otimizada no nosso trabalho e estará descrita no decorrer do trabalho.

2.2.4 Efeitos fisiológicos dos peptídeos inibidores da ECA

Estudar a resistência a digestão desses peptídeos inibidores é de grande importância fisiológica, já que esses peptídeos precisam alcançar a corrente sangüínea na forma ativa para exercer o efeito antihipertensivo. A digestão gastrointestinal e o transporte são as principais barreiras para a biodisponibilidade dos peptídeos inibidores da ECA.

Ensaio de digestibilidade “in vivo” e “in vivo” têm sido desenvolvidos com esse objetivo.

“IN VITRO”

Os ensaios “in vitro” se baseiam na incubação dos peptídeos com as enzimas pepsina, tripsina, quimotripsina e pancreatina em condições ótimas de hidrólise fisiológica (MATSUI *et al.*, 2002, CHOI *et al.*, 2001, MAENO, YAMAMOTO e TAKANO, 1996).

Matsui *et al.* (2002) sugere que o processo de produção do hidrolisado contendo peptídeos inibidores seja realizado com proteases do trato gastrointestinal, devido à vantagem de produzir peptídeos que seriam resistentes a digestão fisiológica após o consumo oral.

As condições fisiológicas para a digestão gastrointestinal são conhecidas. As proteínas são clivadas no estômago pela ação da pepsina, com pH variando entre 1 e 2. No intestino, as endopeptidases como a tripsina, quimotripsina e elastase e as carboxipeptidases A e B continuam a clivagem da cadeia polipeptídica em um meio alcalino (pH entre 7 e 8). Nas membranas de borda em escova, os oligopeptídeos são clivados pelas amino, di- e endopeptidases, resultando em uma mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos, os quais são transportados pelos enterócitos. O tempo médio de esvaziamento gástrico é de 0,5 a 3 horas, enquanto a permanência no duodeno e jejuno é de 2 a 2,75 horas e no íleo de 5 a 7 horas (OOMEN *et al.*, 2002; GANAPATHY e LEIBACH, 1999; CHARMAN *et al.*, 1997).

VERMEIRSEN *et al.* (2003) estudaram a liberação ou degradação de peptídeos inibidores da ECA durante a digestão gastrointestinal das proteínas do soro de leite e da ervilha, utilizando três modelos de digestão, a digestão não-ótima, a digestão fisiológica e a digestão fisiológica, por um tempo prolongado, como é apresentado na **TABELA 5**.

Para o modelo de digestão não-ótima, o valor de pH utilizado é igual a 4 (estômago) e 5 (intestino), por considerar que no período pós-prandial, esses seriam os valores de pH do estômago e do intestino, respectivamente. A digestão fisiológica foi desenvolvida utilizando como parâmetros o pH e o tempo de digestão considerados fisiológicos, tanto no estômago como no intestino. Já o modelo de digestão classificado pelo autor como fisiológico prolongado, os valores de pH são iguais ao anterior, porém o tempo de incubação é superior, com duas horas a mais, tanto no estômago como no intestino.

Os autores observaram que quando a digestão foi realizada dentro das condições fisiológicas, os peptídeos formados apresentaram uma maior atividade inibitória, com valores de IC₅₀ entre 0,076mg/ml para ervilha e 0,048 mg/ml para as proteínas do soro, porém, não foi observada uma correlação positiva entre o grau de hidrólise e a liberação dos peptídeos com atividade inibidora da ECA.

TABELA 5 – Modelos de digestão propostos por VERMEIRSEN *et al.* (2003) para estudos da resistência de peptídeos a digestão gastrointestinal

Modelos de digestão	<u>Estômago</u>		<u>Intestino delgado</u>	
	pH	Tempo de incubação (horas)	pH	Tempo de incubação (horas)
Não-ótima	4	0,5	5	0,5
Fisiológica	2	2	6,5	2,5
Fisiológica (tempo prolongado)	2	4	7	4,5

“IN VIVO”

Ensaio “in vivo” também são bastante utilizados para verificar a eficiência de peptídeos com atividade anti-hipertensiva. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são utilizados como modelo para pesquisa de agentes hipertensivos “in vivo” pelas características semelhantes da hipertensão entre essa linhagem e o homem. Além do desenvolvimento da hipertensão, esses animais desenvolvem doenças cardiovasculares e sofrem influência genética e ambiental sendo sensíveis à administração de sódio (FUJITA, YAMAGAMI e OHSHIMA, 2001, YAMAMORI, 1988).

A medida da pressão arterial nos ratos geralmente é realizada pela medida da pressão caudal. O valor da pressão deve representar a média, de no mínimo, três medidas. ASTAWAN *et al.* (1995), estudando hidrolisados protéicos de atum com pepsina, tripsina, quimotripsina e pronase de *Streptomyces griseus*, observaram que o hidrolisado obtido com pepsina apresentou a maior atividade inibitória ($IC_{50} = 0,63\text{mg/mL}$) em relação aos demais. Após os passos de purificação, quatro peptídeos foram identificados como sendo os responsáveis pela inibição da ECA, Val-Ala-Trp-Lys-Leu ($IC_{50} = 31,97\mu\text{M}$), Trp-Ser-Lys-Val-Val-Leu ($IC_{50} = 156,28\mu\text{M}$), Ser-Lys-Val-Pro-Pro

($IC_{50} = 74,22\mu M$) e Cys-Trp-Leu-Pro-Val-Tyr ($22,22\mu M$). Estes peptídeos diminuíram significativamente a pressão arterial dos ratos.

FUJITA, YAMAGAMI e OHSHIMA (2001) avaliaram o efeito anti-hipertensivo do peptídeo LKP ($IC_{50} = 0,32\mu M/l$), obtido por hidrólise com termolisina do músculo do peixe bonito, em animais SHR e em humanos. No ensaio com humanos, o efeito anti-hipertensivo de 1,5g/dia do peptídeo (administrado na forma de tabletes) foi monitorado contra um placebo em um estudo duplo-cego, randomizado, com indivíduos que apresentavam hipertensão leve. O peptídeo foi responsável por um efeito anti-hipertensivo, sem efeitos colaterais.

Fuglsang, Nilsson e Nyborg (2002) utilizaram linhagens de *Lactobacillus helveticus*, para produzir leite fermentado rico em peptídeos inibidores da ECA. Esses inibidores são produzidos pela ação das proteinases bacterianas sobre a caseína, durante o processo de fermentação. Devido ao fato do sistema proteolítico destas bactérias ser totalmente inespecífico, clivando a caseína em várias posições, combinado com o fato de que a ECA pode ser inibida por peptídeos com variadas estruturas, pode-se acreditar que existe uma possível correlação entre proteólise, grupamentos amino livres e a inibição da ECA. Então, quanto maior o número de amino grupos formados durante a fermentação, maior é a probabilidade de que a substância fermentada seja capaz de inibir a ECA. Assim, observou-se que a administração de 10 ml/Kg de peso corporal de leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* a ratos espontaneamente hipertensos, produziu uma queda de aproximadamente 30mmHg na pressão sistólica destes animais.

2.3 Peixes como fonte de nutrientes e peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

Dentre as espécies marinhas encontradas no litoral brasileiro, o pescado se apresenta como um importante alimento para a alimentação humana, principalmente por conter proteínas de alto valor biológico.

O músculo de pescado é composto de proteínas de elevado valor nutritivo por conter alta proporção de aminoácidos essenciais, particularmente daqueles aminoácidos que costumam ser limitante em proteínas de origem vegetal, tais como metionina e cistina. Apresenta uma alta sensibilidade à hidrólise proteolítica, sendo assim, fácil e completamente digerido. A digestibilidade protéica não é influenciada pela desnaturação e agregação protéica que ocorre durante o armazenamento (BÁRZANA & GÁRCIA-GARIBAY, 1994; MOREY, 1982).

Os produtos comerciais a base de pescados podem ser derivados de diferentes partes do animal, incluindo músculo, ovas, estômago, rins, fígado, pele e barbatanas. Entretanto, quando se faz referência à carne de pescado, normalmente considera-se apenas o músculo ou polpa do animal (HAARD, 1995).

2.3.1 Produção de Pescado

Desde 1997, dentre os principais produtores mundiais de pescado, o Brasil ocupa o vigésimo sétimo lugar, atrás de alguns países como China (1º lugar), Peru, Japão, Índia, EUA, Indonésia, Chile e Rússia (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2001; FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO/ FIPERJ, 2001).

Em 1999, $\frac{3}{4}$ da produção global de peixes, crustáceos e moluscos (97 milhões de toneladas) foram utilizados para o consumo humano. Projeções realizadas para 2010, estimam uma produção pesqueira mundial entre 107 e 144 milhões de toneladas, das quais 74 a 114 milhões de toneladas estariam sendo destinadas ao consumo humano (FAO, 2002).

Os principais estoques de recursos pesqueiros estão sendo explorados fortemente, e no Brasil, a produção chegou a 671 mil toneladas em 1991. O Brasil apresentou um aumento considerável da produção pesqueira no período de 1965 (389 mil toneladas) a 1979 (855 mil toneladas). Em 1985, a produção pesqueira atingiu o máximo de produção, com 968 mil toneladas. Segundo a FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FIPERJ/2001), a produção nacional de pescado correspondeu a 985 mil toneladas, sendo 26,4% proveniente da aquicultura marinha (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL, 1995).

A corvina, *Micropogonias furnieri*, da família *Sciaenidae*, é um peixe que pode ser encontrado em toda a faixa litorânea brasileira, principalmente nas regiões Sudeste e Sul. Na costa oeste paranaense, a Pescada Piauí foi introduzida e é chamada de Corvina. Vivem em locais com fundo arenoso, de preferência em profundidades de até 100m e normalmente em cardumes não muito numerosos. É considerada uma espécie comercial muito importante e apreciada pelos consumidores brasileiros. No ano de 2000, o PROPESQ/INSTITUTO DE PESCA registrou uma captura ininterrupta durante todo o ano, no Estado de São Paulo, onde no mês de julho foi observada a maior taxa de captura, correspondente a 610.785 kg de corvina (CRIAR E PLANTAR, 2004).

Vale ressaltar, que a captura em massa de peixes marinhos podem levar à extinção de várias espécies, muitas vezes por não se respeitar o período de desova. Já está sendo observado que a demanda de consumo está se tornando maior que a oferta (SPERANDIO, 2002).

A crescente diferença entre a quantidade de peixe capturado e a demanda de consumo tornou a aquicultura uma das alternativas mais viáveis no mundo para a produção de alimentos de alto valor protéico a baixo custo para consumo humano. O Brasil apresenta condições extremamente favoráveis à aquicultura, como um grande potencial de mercado, clima favorável, boa disponibilidade de áreas e grãos para a fabricação de rações animais e um enorme potencial hídrico. São 5,3 milhões de hectares de água.

doce em reservatórios naturais e artificiais, 8.000 km de zona costeira, além de uma extensa rede hidrográfica, que podem ser potencialmente aproveitados na produção de organismos aquáticos (SPERANDIO, 2002).

Entre as várias espécies cultivadas em tanques-redes ou gaiolas, a Tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) é atualmente uma das espécies de maior volume de produção da piscicultura mundial e brasileira, por responder melhor a esse sistema de criação. O continente asiático é o maior produtor mundial de tilápia nilótica e junto com outros países foram responsáveis, em 1994, por cerca de 20% da produção de peixes oriundos da aquicultura. O Brasil, em 1994, produziu 32.000 toneladas de pescado e em 2002, 260.500 toneladas, correspondendo a 26,4% do pescado produzido pelo país. A aquicultura no país é um investimento promissor; sendo necessária contudo, uma visão de agronegócio, criando condições competitivas para o Brasil em nível mundial (MADRID, 2000; FAO, 1996).

Essa espécie, originária dos rios e lagos africanos, foi introduzida no Brasil em 1971, em açudes do nordeste e difundiu-se para todo o país. Substituiu a tilápia-do-Congo (*Tilapia rendalli*), que apesar de bastante disseminada não apresentava resultados satisfatórios em termos de produção.

A tilápia apresenta características importantes para o cultivo, tais como precocidade e facilidade de reprodução e obtenção de alevinos, é um peixe de águas paradas, rústico, suportando o manuseio intensivo e baixos índices de oxigênio, é tipicamente herbívoro e sua carne branca, de textura firme, sem espinhos é de sabor agradável apresentando boa aceitação, além de demonstrar pouca susceptibilidade a doenças parasitárias (SPERANDIO, 2002).

2.4 Hidrolisados protéicos

Hidrolisados protéicos contendo peptídeos de baixo peso molecular, de preferência di e tripeptídeos, são utilizados para o tratamento clínico de pacientes que apresentam complicações gastrointestinais, desnutrição

decorrente de processos tumorais, queimaduras ou outros traumas, diarreia aguda ou crônica, alergias alimentares, ou desordens no metabolismo dos aminoácidos, como na fenilcetonúria (CLEMENTE, 2000; SCHMIDL *et al.*, 1994; FRØKJAER, 1994; MEREDITH *et al.*, 1990; BUZINCO *et al.*, 1989; MILLA *et al.*, 1983).

Na alimentação enteral dá-se a preferência aos hidrolisados protéicos, ricos em peptídeos de baixo peso molecular, devido à excelente absorção gastrointestinal e à sua baixa osmolalidade, sendo estes melhor utilizados pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos livres (SIEMENSMA *et al.*, 1993; ZIEGLER *et al.*, 1990; ADIBI, 1989; ARAI *et al.*, 1986).

Um outro campo de estudo e de aplicação para os hidrolisados protéicos seria a obtenção de peptídeos pequenos, biologicamente ativos, os quais podem desempenhar várias funções, regulando ou inibindo a atividade enzimática, atuando como antibióticos, hormônios, agentes antivirais e antibacterianos ou imunomoduladores (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001; GILL *et al.*, 1996).

A aplicação dos hidrolisados varia em função da distribuição do peso molecular dos peptídeos. Assim, peptídeos com pesos moleculares entre 5 e 20kDa são geralmente utilizados como fontes de nitrogênio em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos e peptídeos com pesos moleculares menores que 5kDa são oriundas de proteínas altamente hidrolisadas e são freqüentemente utilizadas em formulações hipoalergênicas (MAHMOUD, 1994).

Formulações à base de hidrolisados protéicos com alto teor de aminoácidos ramificados (ACR), valina, leucina e isoleucina, e com um baixo conteúdo em aminoácidos aromáticos (AA), fenilalanina e tirosina, podem ser empregadas com sucesso no tratamento dietético de pacientes com lesões hepáticas crônicas, incluindo a encefalopatia hepática (BAUTISTA *et al.*, 1996; ADACHI *et al.*, 1991; TANIMOTO *et al.*, 1991; FISCHER & BOWER, 1981; FISCHER *et al.*, 1976).

As proteínas mais comumente usadas para a produção de hidrolisados protéicos são as derivadas do leite (caseína, lactoalbumina e as proteínas do soro), da soja, da carne e as de pescados (LAHL & BRAUN, 1994; FREITAS *et al.*, 1993).

Como já visto no decorrer dessa revisão, o pescado é utilizado como matéria-prima para a obtenção de hidrolisados, devido à formação de uma série de peptídeos biologicamente ativos de grande interesse na formulação de alimentos, sendo também aplicáveis na indústria farmacêutica e na indústria de cosméticos.

A hidrólise protéica é realizada preferencialmente por via enzimática, em condições brandas e controladas, garantindo assim a manutenção da qualidade nutricional dos aminoácidos e produzindo hidrolisados com um perfil peptídico bem definido e reproduzível. Esse processo de hidrólise é controlado pela determinação do grau de hidrólise (GH), sendo este utilizado como um indicador para comparar diversos hidrolisados protéicos entre si (LAHL & BRAUN, 1994; SIEMENSMA *et al.*, 1993; MAHMOUD *et al.*, 1992; ADLER-NISSEN, 1986).

A hidrólise enzimática de pescados parece ser a alternativa mais viável para a obtenção dos peptídeos com atividade biológica. Neste processo, enzimas proteolíticas são utilizadas para solubilizar as proteínas (DINIZ e MARTIN, 1997).

Existem várias proteases comerciais obtidas de fontes animais, vegetais, microbianas ou fúngicas que podem ser utilizadas no processo de hidrólise, (**QUADRO 6**). São classificadas de acordo com as características estruturais dos sítios ativos. Os principais grupos são: serinoproteinases (EC 3.4.21), SH-proteinases (EC 3.4.22), carboxilproteinases (EC 3.4.23) e metaloproteinases (EC 3.4.24) (GERHARTZ, 1990).

As enzimas proteolíticas costumam apresentar preferência por alguns sítios da proteína, por exemplo, a pepsina hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas das quais participem grupos carboxílicos de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), enquanto a tripsina reconhece

apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina (GERHARTZ, 1990).

O pH, temperatura, relação enzima/substrato, entre outros fatores, são parâmetros importantes que precisam ser estudados, pois são responsáveis pelo grau de hidrólise, o qual está diretamente relacionado com o massa molecular dos peptídeos liberados e conseqüente liberação de peptídeos solúveis ou insolúveis com propriedades funcionais características. A escolha da enzima depende da especificidade do substrato e das condições de trabalho, como temperatura, pH e relação enzima/substrato que deverão ser empregados, permitindo um processo controlado, rápido e contínuo (LAHL & BRAUN, 1994).

A estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura (LAHL & BRAUN, 1994).

Todas as enzimas apresentam um valor de pH e temperatura ótimos, para qual a sua velocidade é máxima, sendo que, a velocidade da reação diminui à medida que o pH e a temperatura se afastam desse valor ótimo, como pode ser observado no **QUADRO 6**. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares, inclusive as enzimas, são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda do poder de catálise (DINIZ e MARTIN, 1997 e GERHARTZ, 1990).

A quantidade de enzima utilizada no processo de hidrólise costuma representar 1/50 ou 1/100 em relação ao substrato, não chegando a interferir no conteúdo total de nitrogênio no produto final.

QUADRO 6- Enzimas proteolíticas utilizadas no processo de hidrólise das proteínas do peixe^a

Enzima	Fonte	Tipo de protease	pH ótimo	T ótima °C
Microbiana				
alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Serinoprotease	6,5 – 8,5	55 – 70
neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	Metaloprotease	5,5 – 7,5	45 – 55
pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	Protease alcalina e neutra, aminopeptidase e carboxipeptidase	7,0 – 9,0	37
Animal				
quimotripsina	Bovina / Porco	Serinoprotease	7,0 – 9,0	40
pancreatina	Bovina / Porco	Mistura de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase	7,0 – 9,0	40
pepsina	Bovina / Porco	Peptidase aspártica	2,0 – 4,0	40
tripsina	Bovina / Porco	Peptidase serínica	7,0 – 9,0	40
Vegetal				
bromelina	Caule do abacaxi	SH- Protease	5,0 – 8,0	50 – 60
ficina	Látex de figo	SH- Protease	5,0 – 8,0	30 – 50
papaína	Látex do Mamão	SH- Protease	5,0 – 7,0	65 – 80

^aAdaptado de DINIZ e MARTIN, 1997 e GERHARTZ, 1990.

Enzimas como a termolisina e a protease de *Bacillus licheniformis* são bastante utilizadas para obtenção de peptídeos com atividade inibitória da ECA, porém, como não são enzimas comuns ao organismo humano podem causar alergia alimentar em pessoas sensíveis. A pepsina, quimotripsina e a tripsina também são utilizadas na obtenção de peptídeos com atividade biológica, por serem enzimas produzidas naturalmente pelo trato gastrointestinal (ASTAWAN *et al.*, 1995; MATSUFUJI *et al.*, 1994; YOKOYAMA *et al.*, 1992).

A massa molecular dos hidrolisados é descrito na literatura como um dos fatores mais importante para a obtenção de hidrolisados protéicos com atividade biológica. A separação das frações peptídicas por faixas de massa molecular tem sido realizada por cromatografia em gel ou por cromatografia líquida de alta eficiência com colunas contendo resinas de exclusão molecular. Processos de ultrafiltração utilizando membranas de exclusão

molecular também são descritos na literatura com o mesmo objetivo, entretanto, é um processo mais simplificado e de menor custo que a separação cromatográfica para a produção em larga escala de frações peptídicas com características desejáveis (CALDERÓN DE LA BARCA, 2000; JEON, BYUN, KIM, 1999; POULIOT *et al.*, 1999; BAUTISTA *et al.*, 1996; PEREA *et al.*, 1993).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a presença e a atividade de peptídeos inibidores da atividade da ECA em hidrolisados enzimáticos dos peixes Tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus* – linhagem tailandesa) e Corvina (*Micropogonias furnieri*).

3.2 Específicos

- Caracterizar a matéria-prima utilizada;
- Otimizar a metodologia para medida da atividade inibitória da ECA, descrita por ARAÚJO *et al.*, 2000;
- Estudar a presença de peptídeos inibidores da ECA em hidrolisados enzimáticos de peixes
- Estudar a relação entre o tempo de hidrólise e a liberação dos peptídeos inibidores da ECA;
- Estudar a especificidade dos peptídeos inibidores da ECA perante os domínios C e N da ECA;
- Estudar a estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA presentes nos hidrolisados quando submetidos a hidrólise “in vitro” que mimetiza o processo de digestão;
- Estudar a liberação de peptídeos inibidores da ECA a partir do “minced” dos peixes por enzimas gastrointestinais;
- Separar os peptídeos inibidores da ECA obtidos pelo sistema enzimático pepsinal/*Streptomyces griseus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostras

A corvina (capturada na região do Itajaí – SC) e a tilápia (proveniente de cultivo da região de Araraquara e Piracicaba – SP), doadas pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), foram transportadas em caixa isolante, com gelo, para a empresa TAKAKI Cia. Ltda. (Suzano, SP), na qual foram desossadas, lavadas (uma única vez), e prensadas para remoção da água, sem adição de crioprotetores, de acordo com o procedimento padrão adotado na empresa. O “minced” assim obtido foi congelado e liofilizado para ser utilizado como matéria-prima no processo de hidrólise enzimática.

4.1.2 Reagentes

As enzimas pepsina da mucosa de estômago de porco, 1:60000 (P-7012), *Streptomyces griseus* (P-5147) e a enzima conversora da angiotensina I de pulmão de coelho (A-6778) foram adquiridas da Sigma Chemical Company, St. Louis. A papaína (Brauzyn 100), grau alimentício, foi cedida pela Prozyn. O substrato Abz foi sintetizado em fase sólida, no laboratório do INFAR da UNIFESP, Sephadex G-15 e G-25, com faixas de exclusão molecular acima de 1500 Dalton e entre 1000 e 5000 Dalton, respectivamente, foram obtidos da Amersham Pharmacia. Demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.3 Equipamentos e materiais especiais

Filtros com membranas de exclusão por massa molecular (“Centricon concentrators” – AMICON, Beverly, MA) e Espectrofluorímetro Hitachi F-2000 com fenda de excitação ajustada para λ_{ex} 320nm e emissão λ_{em} 420nm, com banho termostaticado (37 a 38°C) sob agitação constante (agitador para cubeta).

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção dos peptídeos por hidrólise enzimática

Os hidrolisados de peixe foram obtidos conforme procedimentos descritos por DE MIRA *et al.*, 2001. Um esquema sucinto é apresentado na **FIGURA 9**. Optamos, inicialmente, por um sistema sequencial de enzimas (pepsina 1:60.000 seguida da protease de *Streptomyces griseus*), **TABELA 6**. Assim foram obtidos os primeiros hidrolisados, H_{T1}(Tilápia) e H_{C1}(Corvina).

Um terceiro hidrolisado foi obtido (H_{T2}) utilizando uma enzima comercial, a papaína. Esse processo de hidrólise foi realizado apenas com o peixe tilápia. A concentração da enzima foi escolhida de acordo com as instruções da Prozyn.

Como controle, amostras dos “minced” tanto da tilápia, bem como da corvina foram submetidas às mesmas condições de hidrólise, porém, sem adição de enzimas, o qual foi denominado de autolisado, A_T e A_C, para os peixes tilápia e corvina, respectivamente.

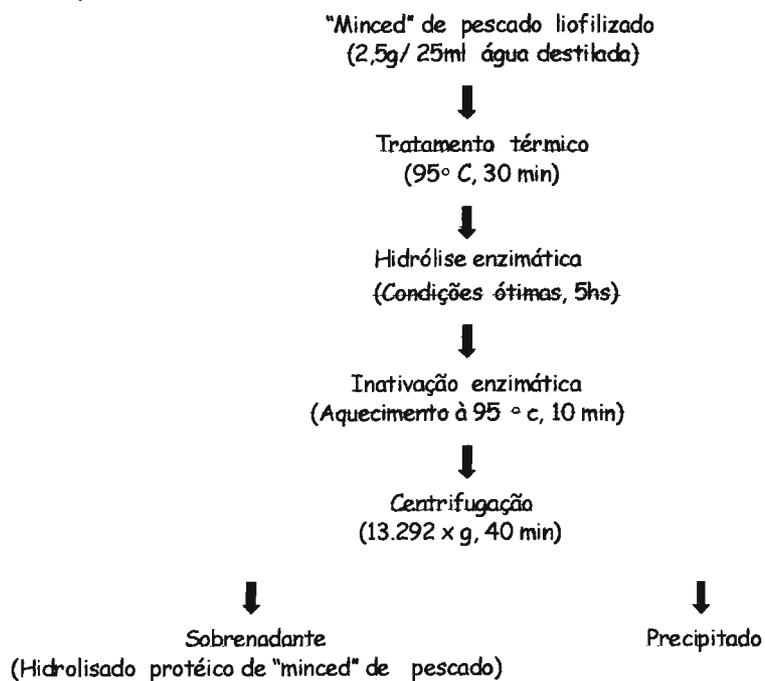


FIGURA 9 - Fluxograma do processo de preparação do hidrolisado protéico de pescado

Antes da adição das enzimas, a solução contendo o "minced" mais água foi aquecida por 30 minutos em água fervente, para desnaturação das proteínas, e resfriadas em banho de gelo. Todos os ensaios foram realizados nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima (o pH foi corrigido com soluções de NaOH 1N ou HCl 1N), por um período de cinco horas, conforme apresentado na **TABELA 6**.

TABELA 6 - Sistemas enzimáticos utilizados para a obtenção dos hidrolisados e seus respectivos graus de hidrólise.

Ensaio	Sistema Enzimático	Condições das reações				
		E:S (p/p)	pH	T (°C)	Tempo(h)	S:H ₂ O
H _{T1}	Pepsina 1:60.000/	1:100 /	2,0 /	37	3 / 2	2,5:50
	<i>Streptomyces griseus</i>	1:100	6,0			
H _{C1}	Pepsina 1:60.000/	1:100 /	2,0 /	37	3 / 2	2,5:50
	<i>Streptomyces griseus</i>	1:100	6,0			
H _{T2}	Papaína	1:200	6,5	60	5	5,0:60
A _C	Autólise	-	-	37	5	-
A _T	Autólise	-	-	37	5	-

A relação enzima:susstrato (E:S) foi determinada em função da concentração de proteína presente na amostra. T (temperatura); A relação S: H₂O corresponde a relação substrato (minced):água.

Durante o período da hidrólise, as amostras foram mantidas sob agitação constante. Após cinco horas, os hidrolisados foram aquecidos à 95°C por 10 min para inativação enzimática.

Obtivemos o sobrenadante e o precipitado por centrifugação à 13292 x g, por 40 min, separando o resíduo insolúvel (precipitado) do hidrolisado (solúvel). O precipitado foi descartado e o sobrenadante, congelado para posterior análise da atividade inibidora dos peptídeos obtidos.

4.2.2 Análise da composição química dos "Minced"

A composição química foi determinada de acordo com métodos descritos na ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1995). A análise da concentração de nitrogênio foi realizada conforme o método de micro-Kjeldahl e o resultado multiplicado por 6,25 para conversão em proteína. A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C, até peso constante. O resíduo mineral fixo foi determinado por incineração em mufla a 550°C. Lipídeos foram determinados pelo método de Folch (FOLCH, LEES, SLOANE STANLEY, 1957), indicado para tecidos animais com alto teor de umidade.

4.2.3 *Fracionamento do hidrolisado utilizando membranas de ultrafiltração*

A separação das frações peptídicas por faixa de massa molecular foi realizada por ultracentrifugação em membrana de exclusão por massa molecular, utilizando os “Centricon concentrators” mediante instruções do fabricante.

Peptídeos maiores que 30, entre 10 e 30 e menores que 10KDa foram determinados, usando membrana de exclusão molecular de 30Kda e 10Kda, respectivamente. As frações correspondentes foram denominadas A (massa molecular maior que 30kDa), B (massa molecular entre 10 e 30kDa) e C (massa molecular menor que 10kDa).

4.2.4 *Fracionamento do hidrolisado por cromatografia em gel*

O fracionamento do hidrolisado foi feito por cromatografia em gel em colunas empacotadas com Sephadex G-15 ou Sephadex G-25, coletando-se em torno de 50 frações. A eluição foi monitorada à 254nm e as frações agrupadas de acordo com o perfil do cromatograma. As frações combinadas foram congeladas e liofilizadas para posterior análise da atividade inibitória.

Condições cromatográficas:

Coluna: diâmetro interno de 1,7cm por 70cm de altura;

Fase Móvel: etanol 20%

Fluxo: 2mL/hora

Temperatura ambiente

Tempo de descarte: 30 minutos

Tempo de coleta/ tubos: 25 minutos / tubo

Sensibilidade do monitor: 0,05

Deteção: comprimento de onda 254nm;

4.2.5 Análise do teor protéico nas frações peptídicas

A concentração protéica nas frações peptídicas obtidas foi determinada segundo método descrito por BRADFORD (1976), com algumas modificações. A reação baseia-se na formação de uma coloração azul pela reação do reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250*, com aminoácidos básicos e aromáticos, resultando em uma mudança de absorvância, no máximo, de 465nm (marrom) para 595nm (azul). Para a análise, acrescentou-se a 0,1mL da amostra, 0,9mL de água. Adicionando-se 0,2mL do reagente, agitando os tubos vigorosamente. A absorvância é lida à 595nm em espectrofotômetro (Beckman DU-70[®]) contra um branco até 30 minutos, após a adição de reagente. Utilizou-se uma curva padrão de albumina nas concentrações de 4µg; 6µg; 9µg; 12µg e 14µg. Os resultados são expressos como µg de proteína em 100µL de amostra.

4.2.6 Medida da atividade inibitória da ECA por ensaio "in vitro"

A atividade inibitória da enzima foi determinada seguindo método descrito por ARAÚJO *et al.* (2000), com algumas modificações. Esse método se baseia na hidrólise de um peptídeo sintético com supressão intramolecular de fluorescência do tipo Abz-peptidil-K(Dnp)-X-OH pela ECA, o qual contém um grupo fluorescente Abz (ácido orto-amino benzóico), ligado ao grupo N-terminal do peptídeo e ao grupo apagador Dnp (2,4-dinitrofenil) incorporado ao ε-amino grupo de um aminoácido da cadeia peptídica. O peptídeo utilizado no nosso ensaio é do tipo Abz-YRK(Dnp)P-OH.

Após a hidrólise, ocorre a liberação do produto Abz-YR responsável pela fluorescência que pode ser detectada continuamente em um fluorímetro. O aumento dessa fluorescência devido à hidrólise foi continuamente registrado até 100 segundos.

A inibição da ECA foi expressa em função da quantidade de proteína (mg/ml) ou volume de solução (ml/ml) necessária para inibir 50% da atividade desta enzima, sendo expresso como IC₅₀. É importante observar que quanto

menor o valor IC₅₀, maior a atividade inibitória sobre a ECA. Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizado o programa GRAFIT, versão 5.0 (LEATHERBARROW, 1992).

Essas análises foram realizadas no Departamento de Biofísica na Universidade Federal de São Paulo, com a colaboração da Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona.

4.2.7 Ensaio de digestibilidade “in vitro” do “minced” de tilápia

O “minced” liofilizado foi ressuspenso em água destilada (5:100, p/v) e submetido à tratamento térmico em banho-maria fervente por 30 minutos (H_{T3}), sendo em seguida, resfriado em banho-de-gelo. A hidrólise foi realizada utilizando pepsina, tripsina e quimotripsina, nas condições ótimas de temperatura, pH e tempo de hidrólise para cada enzima, obedecendo as condições fisiológicas do organismo, conforme apresentado na **TABELA 7**, segundo o método descrito por VERMEIRSEN *et al.*, 2003. O pH foi ajustado com soluções de NaOH 1 N ou HCl 1N antes da hidrólise.

TABELA 7 – Condições de hidrólise do “minced” de tilápia

	E:S (p/p)	pH	t(h)
Estômago (Pepsina)	1:250	2	2
Intestino delgado (Tripsina + quimotripsina)	1:250	6,5	2,5

A relação enzima:substrato (E:S) foi determinada em função da concentração de proteína presente na amostra.

Durante a hidrólise, as amostras foram mantidas sob agitação lenta (110rpm/min) em agitador de frascos (Julabo, SW 20, Seelbach, Ger). A pepsina foi utilizada nas primeiras duas horas de hidrólise. A tripsina e a quimotripsina foram acrescentadas após a ação da pepsina, alterando-se o pH e a temperatura para as condições ideais da segunda enzima. Após quatro horas e meia, a hidrólise foi interrompida por aquecimento em banho-maria fervente, por 15min, para a inativação das enzimas. Os hidrolisados

foram centrifugados (13292 x g, por 40min, centrífuga Sorvall, RC-5B, Newtown, USA) e os sobrenadantes liofilizados e armazenados a -18°C , até o momento das análises da atividade inibitória. Os precipitados foram secos em estufa ventilada a 60°C , analisados quanto ao teor de nitrogênio, calculando-se a partir deste dado, a porcentagem de proteína recuperada.

4.2.8 Estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA presentes nos hidrolisados quando submetidos a hidrólise "in vitro" que mimetiza o processo de digestão

Os hidrolisados contendo peptídeos inibidores da ECA, obtidos pela hidrólise com pepsina/*Streptomyces griseus*, foram submetidos ao mesmo processo de simulação da digestão gastrointestinal, descrito no item anterior, com o intuito de verificar a estabilidade destes peptídeos. Após quatro horas e meia, a hidrólise foi interrompida por aquecimento em banho-maria fervente, por 15min, para a inativação das enzimas. Os hidrolisados obtidos foram armazenados a -18°C , até o momento das análises da atividade inibitória.

4.2.9 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi definido como sendo o número de amino grupos livres formado durante o rompimento das ligações peptídicas, em relação ao número total de aminoácidos existente na amostra, como apresentado pela equação:

$$\text{GH (\%)} = [(\text{equivalentes leucina após hidrólise enzimática} / \text{equivalentes leucina na amostra após hidrólise ácida total}) \times 100] \text{ [21, 25].}$$

Durante a hidrólise, alíquotas de 1mL foram retiradas, em intervalos de tempo de acordo com cada processo de hidrólise, e acrescidas de 1mL de TCA 20%, para precipitação das proteínas.

A concentração de amino grupos livres (equivalentes de leucina) no sobrenadante foi determinada pela reação com ninidrina, conforme o método

descrito por HOLT & SOSULSKI [20], com algumas pequenas modificações. Acrescentou-se a 0,1mL da amostra, 1,0mL de solução de ninidrina e os tubos foram mantidos em banho-maria fervente por exatamente 20 minutos, sendo resfriados, a seguir, em banho-de-gelo. Adicionaram-se 5,0mL de etanol a 50%, agitando os tubos vigorosamente e a absorbância foi lida a 570nm em espectrofotômetro (Beckman DU-70⁰, Muskegon, USA), contra um branco, até 30 minutos após a adição de etanol. A L-Leucina em diferentes concentrações (0,5 a 2,0 = mM) foi utilizada para a construção da curva-padrão. Os resultados foram expressos em mmoles de equivalentes de leucina por g de proteína.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos peixes Tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus* – linhagem tailandesa) e Corvina (*Micropogonias furnieri*) para o estudo da obtenção de hidrolisados protéicos com atividade inibitória da ECA se baseou no fato destes peixes serem amplamente consumidos no Brasil, apresentarem baixo teor de gordura em relação a outros pescados, uma produção ininterrupta no decorrer do ano e representarem peixes de água salgada (corvina) e de água doce (tilápia).

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é uma espécie importante comercialmente e apreciada pelos consumidores brasileiros, sendo característica do litoral brasileiro, porém também é encontrada na Argentina, Costa Rica e Nicarágua. Vem ocupando o segundo lugar na produção de pescado no Estado de São Paulo, ficando apenas atrás da sardinha-verdadeira. No último relatório técnico publicado pelo PROPESQ/INSTITUTO DE PESCA (2003) sobre a produção pesqueira marinha no Estado de São Paulo referente ao ano de 2000, verifica-se que a produção de corvina (*Micropogonias furnieri*) foi ininterrupta durante todo o ano e, no mês de julho, foi observada a maior taxa de captura, correspondente a 610.785 kg de corvina, como ilustrado na **FIGURA 10**.

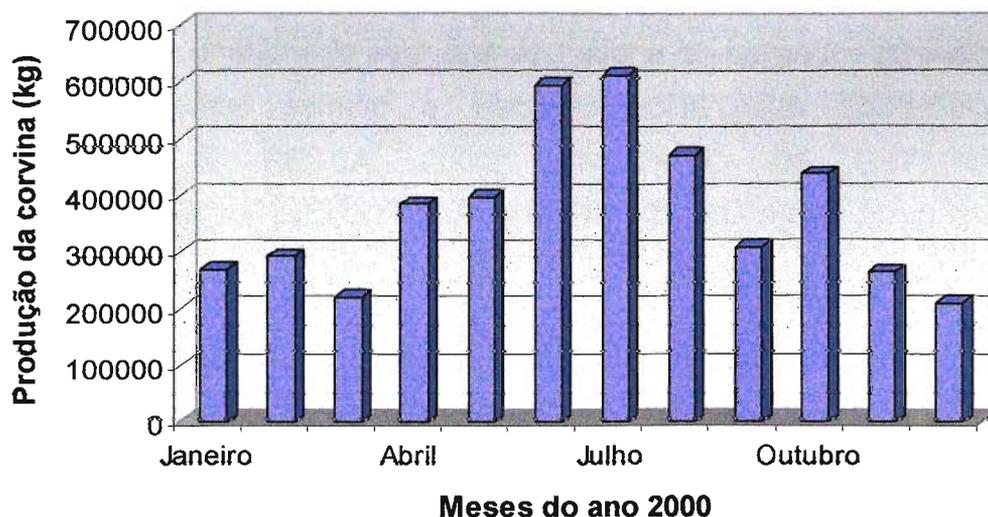


FIGURA 10 – Produção pesqueira do peixe corvina, controlada por mês, no ano de 2000 (Instituto de Pesca do Estado de São Paulo)

No ano de 2003, a produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo correspondeu a 58.400 mil toneladas e destas, 9,5% representaram a pesca da corvina (IBAMA, 2003).

Quanto à tilápia, um peixe de consumo mundial, é produzido por meio da aquicultura, com destaque para o gênero *Oreochromis*. Atualmente, a tilápia tailandesa, linhagem desenvolvida no Japão, melhorada na Tailândia e introduzida no Brasil em 1996, é a mais cultivada (MADRID, 2000; FAO, 1996).

A aquicultura continental representou, no ano de 2003, 177.125,5 mil toneladas de pescados, moluscos, crustáceos e anfíbios. O cultivo da tilápia representou 36,62% dessa produção (IBAMA, 2003).

Devido à crescente diferença entre a quantidade de peixe capturado e a demanda de consumo, a aquicultura passou a ser uma das alternativas mais viáveis no mundo para a produção de peixes a baixo custo. A tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de maior volume de produção da piscicultura mundial e brasileira, por responder melhor ao sistema de criação, com reprodução em cativeiro.

No Brasil, a produção da tilápia vem apresentando um considerável crescimento também no volume de exportação, mostrando-se uma atividade promissora. No ano de 2004, a exportação da tilápia apresentou um aumento de mais de 100% em relação ao ano anterior, com uma diminuição de 40,45% no preço, seguindo à mesma tendência mundial (17% de redução de preço nos últimos 7 anos), comparando-se à grande maioria de pescados cultivados em larga escala, como salmão e carpa (SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA, 2004; MINISTÉRIO DE ESTADO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2004).

5.1 Composição química do “minced” de tilápia e corvina

Os *minced* obtidos a partir dessas duas espécies de peixes foram a matéria-prima para a obtenção de hidrolisados enzimáticos e sua composição química é apresentada na **TABELA 8**.

TABELA 8 - Composição química das amostras dos “minced” de peixes

	<i>Umidade</i>	<i>Proteína (N x 6,25)</i>	<i>Lipídeos</i>	<i>Cinzas</i>
	<i>g / 100g amostra integral</i>			
Tilápia	80,48 ± 0,6	16,46 ± 0,5	2,20 ± 0,1	0,97 ± 0,0
Corvina	80,25 ± 0,2	17,41 ± 0,1	1,78 ± 0,3	1,04 ± 0,0

Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=4) ± desvio padrão

A composição química foi similar para as duas espécies de peixes, contendo teores protéicos de aproximadamente 17%. Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, onde foi encontrado que o conteúdo protéico das carnes de pescado varia de 15 a 24%. A proteína é de alto valor biológico, por conter todos os aminoácidos essenciais em proporção adequada e por apresentar uma elevada digestibilidade; garantindo, assim, um excelente suprimento nutricional ao organismo (BÁRZANA e GARCIA-GARIBAY, 1994; SANCHEZ, 1989).

O músculo de pescado pode conter 60 a 85% de umidade, 1 a 2% de resíduo mineral, 0,3 a 1% de carboidratos e 0,6 a 36% de lipídeos, sendo que este último componente apresenta esta ampla variação em vista ao tipo de músculo corporal e espécie de peixe analisados, sexo, idade, época do ano, *habitat* e dieta (OGAWA e MAIA, 1999).

Os teores lipídicos da corvina e da tilápia foram de aproximadamente 2%, caracterizando-os como “magros”. A escolha de peixes magros foi proposital por apresentarem maior estabilidade oxidativa, ou seja, retardando a sua deterioração durante o manuseio, análise e armazenamento do produto final para este estudo. Somando-se a isto, acarreta o aumento da vida útil do hidrolisado obtido.

5.2 Caracterização dos hidrolisados obtidos a partir dos “minced” de tilápia e corvina

Os hidrolisados de tilápia (H_{T1}) e corvina (H_{C1}) foram obtidos pela ação da pepsina seguida pela protease de *Streptomyces griseus*, empregando as

condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima por um período de 5 horas.

Essas enzimas possuem diferentes especificidades, nas quais a pepsina age preferencialmente sobre ligações peptídicas adjacentes aos grupos amino e carboxílicos terminais de aminoácidos aromáticos e aos grupos carboxílicos dos aminoácidos leucina, ácido aspártico e glutamina. A protease bacteriana de *Streptomyces griseus* cliva aleatoriamente os resíduos de aminoácidos; conferindo, dessa forma, um maior grau de hidrólise ao substrato.

Neste trabalho, o sistema enzimático pepsina / *Streptomyces griseus* proporcionou um alto grau de hidrólise, em torno de 34%, para ambos os hidrolisados (TABELA 9). Em estudo anterior (NEVES, DE MIRA e LANFER-MARQUEZ, 2004), foram obtidos vários hidrolisados protéicos de peixe pelo emprego de diferentes sistemas enzimáticos. Após estudo da extensão do grau de hidrólise e distribuição do peso molecular dos hidrolisados, observou-se que o sistema enzimático (pepsina / *Streptomyces griseus*) propiciou um maior grau de hidrólise, semelhante ao obtido no trabalho acima mencionado, em relação aos demais sistemas empregados. Com relação à distribuição do peso molecular, foi verificado que 86% dos peptídeos obtidos por este processo de hidrólise correspondiam a pesos moleculares menores que 10kDa, e destes, 51% a pesos moleculares inferiores a 3kDa.

TABELA 9 – Recuperação protéica e Grau de hidrólise nos hidrolisados H_{T1} e H_{C1}

Hidrolisado	GH (%)	% proteína solúvel (N x 6,25)
H _{T1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	34,2	80,89 ± 2,43
H _{C1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	33,7	76,21 ± 0,80

*Proteína solúvel no hidrolisado; Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=4) ± desvio padrão

De acordo com a literatura, o peso molecular dos peptídeos é um dos fatores mais importantes para a obtenção de hidrolisados protéicos com atividade biológica (JEON, BYUN e KIM, 1999; DEESLIE e CHERYAN, 1991). Peptídeos com baixo peso molecular estão diretamente relacionados com a atividade inibitória da ECA; sendo, portanto, de grande interesse quando se deseja controlar a pressão arterial. ASTAWAN *et al.* (1995), MATSUFUJI *et al.*

(1994) e MASTSUMURA *et al.* (1993), estudando a atividade inibitória *in vitro* de peptídeos presentes em hidrolisados enzimáticos de peixe, observaram que estes possuíam de três a cinco aminoácidos na cadeia peptídica.

JEON *et al.* (1999) separaram o hidrolisado enzimático obtido a partir do músculo do bacalhau em frações com diferentes pesos moleculares (30, 10, 5 e 3kDa). Os autores observaram que a fração com menor peso molecular (3kDa) apresentou a maior atividade inibitória ($IC_{50} = 0,08\text{mg proteína/ml}$) em relação às demais, indicando que os peptídeos inibidores da ECA possuem baixo peso molecular.

Porém, peptídeos com alto peso molecular que apresentavam uma baixa atividade inibitória em ensaios "in vitro", quando administrados oralmente a animais SHR, "in vivo", apresentavam uma atividade mais elevada, diminuindo significativamente a pressão arterial destes animais. Isso aconteceu, provavelmente, devido à digestão pela pepsina e enzimas intestinais a que esses peptídeos foram expostos. Por conseguinte, os peptídeos com reduzidos pesos moleculares foram posteriormente absorvidos pelo intestino, alcançaram a corrente sanguínea e por fim, desempenharam a atividade inibitória.

Nos dois hidrolisados, H_{T1} e H_{C1} , o alto grau de hidrólise obtido resultou em uma elevada solubilidade das proteínas hidrolisadas, em que a recuperação da proteína solúvel foi da ordem de 81 e 76%, para ambos os hidrolisados, respectivamente, como pode ser observado na TABELA 9.

Segundo LIASET (2000), LAHL e BRAUN (1994) e MAHMOUD (1994), o grau de hidrólise está positivamente relacionado à solubilidade da proteína. A alta porcentagem de proteína solúvel recuperada no processo de hidrólise permite a sua utilização como fonte de proteína na alimentação.

5.3 Otimização da medida da atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA) por ensaio "in vitro" descrita por ARAÚJO *et al.* (2000)

O ensaio da atividade inibitória da ECA foi baseado no método originalmente descrito por ARAÚJO *et al.* (2000) para o monitoramento da atividade da ECA em soro, plasma e tecidos.

Este método é fundamentado na hidrólise do peptídeo sintético com supressão intramolecular de fluorescência, Abz-YRK (Dnp)-P-OH pela ECA, medindo-se a velocidade de liberação do grupo fluorescente. Essa velocidade é expressa em unidades arbitrárias de fluorescência / minuto (UAF/min) e aumenta de acordo com o tempo de hidrólise.

A metodologia, originalmente descrita para a medição da atividade da enzima, foi adaptada para a medida da inibição da ECA pelos hidrolisados protéicos dos peixes e de todas as frações obtidas no decorrer deste trabalho.

Após vários testes preliminares, foram otimizadas as condições para realização dos ensaios. Em uma cubeta, foram adicionados 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,0 contendo ZnCl₂ 10 μ M e NaCl 0,05M), 4 μ L (10 μ M) do substrato Abz-YRK-(Dnp)-P-OH diluído em dimetil sulfóxido (DMSO) e 2 μ L da ECA (0,1 unidade de enzima / mL de solução).

Os ensaios foram realizados em fluorímetro com banho termostaticado (37 a 38°C) sob agitação constante. O equipamento utilizado para essa análise foi periodicamente calibrado, calculando-se o valor (constante) que correspondia à fluorescência emitida por 1nM de Abz totalmente hidrolisado, dentro das condições ótimas do ensaio, ou seja, a 100% de liberação de Abz.

Com relação ao substrato, procurou-se utilizar uma quantidade do mesmo cuja concentração fosse duas vezes maior que o Km, para garantir a linearidade da reação por um período de 800 segundos. A concentração da enzima foi ajustada para que houvesse uma liberação de 400 a 500 unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) / minuto, em um período de 100 segundos. Esse valor correspondia a 100% de atividade da ECA no ensaio; sendo, dessa forma, considerado o valor controle no ensaio, nas condições ótimas estabelecidas para o ensaio.

Decorridos os 100 segundos, a reação foi inibida pela adição de 1 μ L do inibidor (hidrolisado ou suas frações) e a velocidade foi medida novamente por mais 100 segundos; verificando-se, deste modo, uma diminuição desta velocidade, proporcional à atividade do inibidor.

Para determinar a concentração, do hidrolisado ou suas frações, necessária para inibir 50% da atividade da ECA, estabeleceu-se que a

velocidade da reação deveria chegar à metade da velocidade medida no ensaio controle (aproximadamente 200 a 250 UAF/min).

Se a adição de 1 μ L do inibidor não resultava em inibição inferior a 50%, adicionavam-se volumes superiores, estipulando-se no máximo 12 μ L, até atingir uma inibição de 50%. Condicionou-se um tempo de ensaio total de até 800 segundos, no qual o aumento da fluorescência, devido à hidrólise do substrato, permanecia na faixa linear.

A inibição da ECA foi expressa em função da quantidade de proteína (mg/ml) ou volume de solução (μ L/ml) necessária para inibir 50% da atividade desta enzima, sendo expressa como IC₅₀. Vale salientar que quanto menor o valor IC₅₀, maior a atividade inibitória sobre a ECA. Por exemplo, se para uma amostra X o valor IC₅₀ é igual a 0,2 e para uma outra amostra Y, o IC₅₀ é 0,4; a amostra X apresentará uma atividade inibitória maior, pois comparando-se com a amostra Y será necessária uma quantidade menor de amostra X para inibir a ECA. Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizado o programa GRAFIT, versão 5.0 (LEATHERBARROW, 1992).

5.4 Atividade inibitória dos hidrolisados de “minced” de tilápia e corvina obtidos pelo uso da pepsina seguida da protease de *Streptomyces griseus*

Na TABELA 10, são apresentados os valores da atividade inibitória dos hidrolisados H_{T1} e H_{C1} sobre a ECA, expressos como IC₅₀. O cálculo deste valor foi baseado na concentração de proteína solúvel nos hidrolisados.

TABELA 10 – Atividade inibitória dos hidrolisados de tilápia (H_{T1}) e corvina (H_{C1}) obtidos pela ação da pepsina seguida da protease de *Streptomyces griseus*

Hidrolisado	GH (%)	IC ₅₀ (mg proteína/ml)*
H _{T1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	34,2	0,040 \pm 0,004 ^a
H _{C1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	33,7	0,036 \pm 0,007 ^a

*Proteína solúvel no hidrolisado; Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=4) \pm desvio padrão

Os hidrolisados H_{T1} e H_{C1} apresentaram atividade inibitória com valores iguais a 0,040 e 0,036mg proteína/ml, respectivamente, sendo semelhantes estatisticamente.

Diversos hidrolisados de peixes, como o atum, o bacalhau, a sardinha e o bonito, têm sido estudados a fim de verificar a possível liberação de peptídeos inibidores da ECA (JEON, BYUN e KIM, 1999; ASTAWAN *et al.*, 1995; MATSUI *et al.*, 1993; YOKOHAMA *et al.*, 1992).

As atividades inibitórias obtidas, no presente trabalho, foram do mesmo grau de grandeza às encontradas por YOKOHAMA *et al.* (1992) em hidrolisados obtidos pela ação da pepsina (IC₅₀ = 0,047mg proteína/ml) e termolisina (IC₅₀ = 0,029mg proteína/ml) sobre o músculo do peixe bonito. Quando esses mesmos autores utilizaram outras enzimas, isto é, tripsina e quimotripsina, nas mesmas condições de hidrólise, foram obtidos valores de IC₅₀ mais altos, 0,16 e 0,12mg proteína/ml, respectivamente, indicando atividades inibitórias mais baixas. As enzimas pepsina e a termolisina, então, foram as principais responsáveis pela liberação dos peptídeos com alta atividade inibitória.

MATSUFUJI *et al.* (1994) ao estudar a obtenção de hidrolisados enzimáticos de sardinha, utilizando para o processo de hidrólise a protease de *Bacillus licheniformis*, obtiveram resultados de IC₅₀ igual a 0,083mg proteína/ml. Essa atividade foi menor quando comparada aos resultados encontrados no trabalho em questão (vide TABELA 10).

Outros autores também têm relatado atividades inibitórias mais baixas. O hidrolisado enzimático obtido pela ação da pepsina sobre o músculo de atum (*Neothunus macropterus*) apresentou valor IC₅₀ igual a 0,63mg proteína/ml, valor este de aproximadamente 15 vezes superior ao obtido neste trabalho (ASTAWAN *et al.*, 1995). Esse mesmo peixe submetido à ação da protease de *Bacillus licheniformis* liberou peptídeos que resultaram em valor IC₅₀ igual a 0,26mg proteína/ml (MATSUI *et al.*, 1993).

Jeon *et al.* (1999) ao estudar o efeito de uma protease extraída do intestino do peixe seguido da ação da pepsina ou de outras enzimas, tais como, tripsina, quimotripsina, *Streptomyces griseus* ou papaína no aparecimento de peptídeos antihipertensivos, a partir da hidrólise do músculo do bacalhau, obtiveram melhores resultados empregando o último sistema

(protease intestinal/papaína), onde o valor IC_{50} correspondeu a 0,050mg proteína/ml, valor este condizente aos encontrados no nosso trabalho, quando utilizamos o sistema pepsina/*Streptomyces griseus*. O hidrolisado obtido no qual foi utilizada a pepsina, a atividade inibitória apresentou-se menor (valor IC_{50} mais alto) em relação às demais enzimas estudadas.

Como os sistemas enzimáticos e as demais condições de hidrólise, como a relação enzima:substrato, substrato:água ou tampão (pH), não são os mesmos, resultados divergentes para o valor de IC_{50} são encontrados na literatura. Somando-se a isto, a especificidade da enzima, bem como o grau de hidrólise precisam ser avaliados. Quando se cliva uma determinada proteína, com uma mesma enzima, porém, com tempo de hidrólise diferente, serão obtidos peptídeos com características peculiares e possivelmente, apresentarão atividades inibitórias distintas.

A preparação do peixe para a hidrólise, assim como sua composição centesimal, também podem interferir na atividade inibitória. A metodologia utilizada para determinar este valor também difere dos trabalhos e acredita-se que isto também seja um importante fator a ser levado em consideração quando se compara a atividade inibitória dos hidrolisados.

5.5 Tempo de hidrólise versus atividade inibitória do hidrolisado de tilápia (pepsina/*Streptomyces griseus*)

Foi avaliada a atividade inibitória dos peptídeos liberados durante o processo de hidrólise do “minced” de tilápia com a enzima pepsina seguida pela protease de *Streptomyces griseus*, e os resultados estão ilustrados na **FIGURA 11**. O valor IC_{50} foi determinado em função da quantidade de hidrolisado (μ L) necessária para inibir em 50% a atividade da enzima em 1mL de solução.

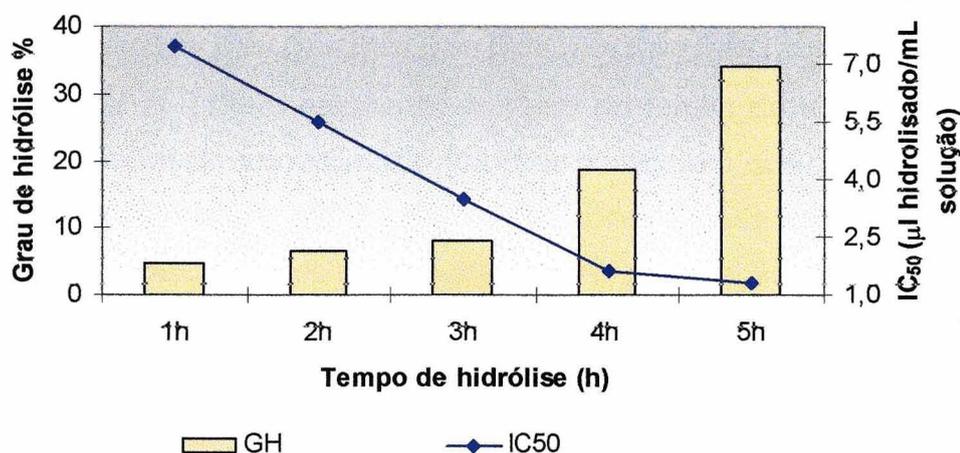


FIGURA 11 – Efeito do grau de hidrólise sobre a atividade inibidora da ECA (Resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata)

De acordo com os resultados, pode-se notar que o valor IC₅₀ diminuiu à medida que o grau de hidrólise aumentou. Em suma, isto significa que quanto maior o grau de hidrólise, maior a liberação de peptídeos com atividade inibitória.

O tempo total de hidrólise correspondeu a cinco horas. No período inicial das três horas de hidrólise, o hidrolisado esteve sob a ação da pepsina e durante esse tempo, o valor IC₅₀ diminuiu de 7,5 para 3,5 μL hidrolisado/mL de solução. Nas horas subseqüentes de hidrólise, foi adicionada ao hidrolisado a protease de *Streptomyces griseus*.

Ao final do tempo total (cinco horas), houve uma redução do IC₅₀ (1 μL hidrolisado/mL de solução); demonstrando, portanto, uma maior atividade inibitória. Este resultado era esperado, já que com o maior grau de hidrólise, peptídeos com massas moleculares menores são liberados, sendo estes responsáveis pelo aumento da atividade inibitória. Esses dados estão de acordo com a literatura, em concordância que quanto maior o grau de hidrólise, maior a liberação de peptídeos com atividade inibidora da ECA (MATSUI *et al.* 1993).

Como já foi descrito nesse trabalho, as enzimas utilizadas no processo de hidrólise possuem diferentes ações enzimáticas e de acordo com os resultados a protease bacteriana de *Streptomyces griseus*, por clivar aleatoriamente os resíduos de aminoácidos, conferiu um maior grau de

hidrólise ao substrato, sendo responsável pela elevada atividade inibitória encontrada.

MATSUI *et al.* (1993) estudando o efeito do tempo de hidrólise versus obtenção de peptídeos com atividade inibitória verificaram que quanto maior o tempo de hidrólise, maior a atividade inibitória, todavia, essa relação variou de acordo com a concentração de enzima utilizada na preparação do hidrolisado.

A relação atividade inibitória versus tempo de hidrólise é muito interessante. ASTAWAN *et al.* (1995) estudaram a atividade inibitória de um hidrolisado por um período de 24 horas e observaram que em três horas de hidrólise, a atividade foi maior que nas horas seguintes e que ao final das 24 horas, essa atividade diminuiu significativamente. Os autores concluíram que quanto maior o tempo de hidrólise, mais alta seria a liberação de peptídeos curtos e aminoácidos livres, os quais seriam responsáveis pela reduzida ou nenhuma atividade inibitória.

Acredita-se, contudo, que após três horas de hidrólise, os peptídeos liberados pela ação das enzimas poderiam se ligar entre si, formando peptídeos maiores e estes, sim, seriam os responsáveis pela menor atividade inibitória apresentada nas horas subseqüentes.

5.6 Estabilidade dos peptídeos inibidores da ECA presentes nos hidrolisados quando submetidos a hidrólise “in vitro” que mimetiza o processo de digestão

Para desempenhar os seus efeitos anti-hipertensivos, os peptídeos inibidores da ECA precisam ser resistentes à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, ser absorvidos e atingir a ECA que está localizada em diferentes tecidos (MEISEL, 1998).

Será que os peptídeos liberados pelo processo de hidrólise continuariam exercendo sua função após a digestão pelas enzimas gastrointestinais?

Para responder a essa questão, os hidrolisados H_{T1} e H_{C1} foram submetidos a um ensaio “in vitro” que simula o processo de digestão “in vivo” (VERMEIRSEN *et al.* 2003) para estudar a estabilidade dos seus peptídeos às enzimas gastrointestinais.

Após a digestão com pepsina, os hidrolisados foram submetidos à hidrólise com tripsina e quimotripsina. Ao analisar a **TABELA 11**, observa-se que os peptídeos antihipertensivos obtidos pela hidrólise do “minced” de corvina e tilápia com pepsina/*Streptomyces griseus* apresentaram estabilidade ao processo digestivo com as enzimas gastrointestinais (pepsina, tripsina e quimotripsina).

Esses resultados indicam que os hidrolisados contendo peptídeos com atividade antihipertensiva, após a digestão gastrointestinal, continuam desempenhando essa função fisiológica e corroboram com dados da literatura que afirmam que a atividade dos peptídeos é conservada após a hidrólise por enzimas gastrointestinais.

TABELA 11 – Estabilidade dos hidrolisados originais H_{T1} e H_{C1} submetidos às enzimas gastrointestinais, onde H_{T1}P e H_{C1}P correspondem aos hidrolisados submetido a ação da pepsina por 2h e H_{T1}PTQ e H_{C1}PTQ, aos hidrolisados H_{T1}P e H_{C1}P submetidos a ação das enzimas tripsina e quimotripsina, por 2,5h

Hidrolisados	IC ₅₀ (mg proteína/ml)
<u>Tilápia</u>	
H _{T1}	0,040 ± 0,004 ^a
H _{T1} P	0,050 ± 0,004 ^b
H _{T1} PTQ	0,040 ± 0,010 ^{a,b}
<u>Corvina</u>	
H _{C1}	0,036 ± 0,007 ^a
H _{C1} P	0,041 ± 0,011 ^a
H _{C1} PTQ	0,040 ± 0,006 ^a

Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=4) ± desvio padrão

MATSUFUJI *et al.* (1994) verificaram que o hidrolisado obtido a partir do músculo de sardinha, sob ação da pepsina (IC₅₀ = 0,083mg proteína/ml), denotou pouca mudança da atividade inibitória, após ser submetido à digestão com enzimas gastrointestinais (IC₅₀ = 0,073mg proteína/ml). Esse hidrolisado continha apenas peptídeos contendo dois a quatro resíduos de aminoácidos e o autor reporta que peptídeos com reduzida massa molecular apresentam

baixa susceptibilidade às enzimas gastrointestinais e são facilmente absorvidos no intestino.

O hidrolisado obtido pela ação da termolisina sob o músculo do peixe bonito ($IC_{50} = 0,029\text{mg proteína/ml}$) foi submetido à ação das enzimas gastrointestinais e não foi observada mudança quanto à atividade inibitória do hidrolisado ($IC_{50} = 0,026\text{mg proteína/ml}$) (YOKOHAMA, CHIBA E YOSHIKAWA, 1992).

Com base nos dados resultantes neste trabalho, os hidrolisados de “minced” de corvina e tilápia obtidos pela ação da pepsina/*Streptomyces griseus*, possivelmente, poderiam passar pelo trato digestório e continuar a exercer sua atividade biológica. Pensando dessa maneira, esses hidrolisados poderiam ser posteriormente administrados, por via enteral, para pacientes que apresentam problemas de hipertensão arterial, como parte do tratamento não medicamentoso da doença.

5.7 Atividade inibidora dos domínios C e N da ECA pelos hidrolisados de corvina e tilápia

A ECA possui dois domínios ativos, o domínio C e o domínio N, referindo-se às porções N e C-terminal da molécula, os quais ela utiliza para se ligar aos substratos ou inibidores. JASPARD, WEI e ALHENC–GEBAS, 1993; WEI *et al.*, 1992 e WEI *et al.*, 1991 ao estudarem a ação desses domínios separadamente notaram importantes diferenças fisiológicas entre os seus subsítios, indicando que esses dois domínios diferem na capacidade de se ligar aos inibidores competitivos da ECA. A ausência ou presença do íon cloro interfere na ativação desses domínios e parece que a seqüência de aminoácidos também é específica para cada domínio.

Esses dados são importantes, principalmente, quando se estudam substâncias capazes de inibir a ECA, pois conhecendo as propriedades e especificidades de cada domínio separadamente, torna-se mais fácil a obtenção de inibidores específicos com constantes catalíticas altas.

De acordo com os resultados adquiridos, os hidrolisados da corvina e tilápia possuem peptídeos com atividade inibitória, entretanto, será que eles

são específicos para apenas um domínio, ou podem se ligar aos dois domínios?

Para esclarecer essa questão, foi avaliada a atividade inibitória dos hidrolisados, empregando a metodologia descrita anteriormente neste trabalho, porém, além da ECA com os dois domínios ativos, a qual sempre foi utilizada nos ensaios, foram usadas as enzimas com apenas um dos domínios livres, como a ECA C (domínio C ativo) e a ECA N (domínio N ativo). Os resultados obtidos são apresentados na **FIGURA 12**.

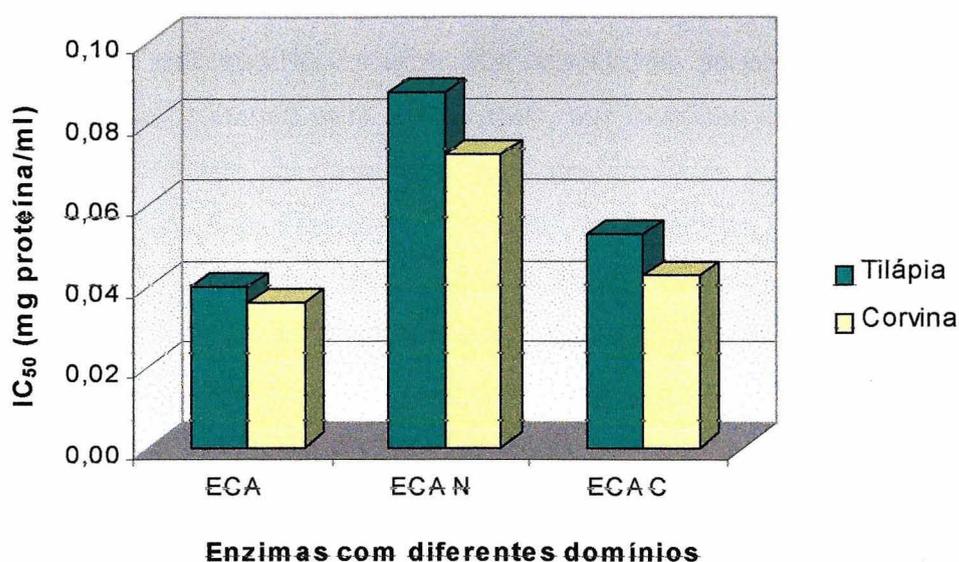


FIGURA 12 – Atividade inibitória dos hidrolisados de tilápia e corvina em relação à ECA (dois domínios ativos), ECA N (domínio C ativo) e ECA C (domínio C ativo)

Como pode ser observado na **FIGURA 12**, os peptídeos se ligam tanto ao domínio C, como ao domínio N, todavia, os melhores resultados de inibição ocorreram quando os peptídeos se ligaram a ambos os domínios ($IC_{50} = 0,040\text{mg proteína/ml}$ e $0,036\text{mg proteína/ml}$, para a tilápia e corvina respectivamente), não apresentando especificidade por um único domínio. Sendo por isto desnecessário um estudo mais abrangente com respeito aos domínios.

Os ensaios com as enzimas que apresentavam apenas um dos domínios livres (ECA N e a ECA C) foram realizados nas mesmas condições

que a ECA com os dois domínios livres. Entretanto, o pH da solução e a concentração do íon cloreto podem interferir nos ensaios. O domínio C-terminal é rapidamente ativado pela presença do íon cloreto ao contrário do domínio N-terminal, o qual é ativo na ausência deste íon. (BERSANETTI *et al.*, 2004; JASPARD, WEI e ALHENC-GEBAS, 1993).

5.8 – Estudo da liberação de peptídeos inibidores da ECA a partir dos peixes por enzimas gastrointestinais

Como já descrito no decorrer dos resultados, os peixes tilápia e corvina são boas fontes protéicas para a liberação, por hidrólise enzimática (pepsina + *Streptomyces griseus*), de peptídeos inibidores da ECA.

Devido ao alto consumo mundial de pescado (cerca de 75% da produção, previsão da FAO para o ano de 2010), nas suas diversas formas de preparo (assado, cozido e frito, além de também ser consumido cru - principalmente na culinária japonesa), decidiu-se avaliar a digestão do “minced” de tilápia para estudar a possível liberação de peptídeos inibidores da ECA pela ação de enzimas digestivas, utilizando-se ensaio de digestibilidade “in vitro”, o qual simula o processo de digestão “in vivo” pelas enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina, segundo o método descrito por VERMEIRSEN *et al.* (2003).

Os peptídeos obtidos pela ação da pepsina e também da pepsina seguida de tripsina + quimotripsina liberaram peptídeos com atividade inibitória, referidos na **TABELA 12**. Conquanto, é importante ressaltar que, os peptídeos liberados após a ação das três enzimas (pepsina / tripsina + quimotripsina) exerceram uma maior atividade inibitória, de aproximadamente 17%, provavelmente devido ao maior grau de hidrólise.

A **TABELA 13** ilustra a atividade inibitória dos peptídeos liberados pela ação dos sistemas enzimático pepsina / *Streptomyces griseus* (H_{T1}) e pelas enzimas gastrointestinais pepsina / tripsina + quimotripsina. Vale salientar que, antes da adição das enzimas, o “minced” foi submetido a uma prévia desnaturação das proteínas por aquecimento em banho-maria por 30 minutos, para facilitar a ação das proteases.

TABELA 12 - Grau de hidrólise do “minced” de tilápia submetido ao ensaio de digestibilidade com as enzimas pepsina (2h) e tripsina + quimotripsina (2,5h) versus atividade inibitória

Hidrolisados	Grau de hidrólise (%)	IC ₅₀ (μL hidrolisado/mL)
“minced de tilápia”		
Pepsina	10,20 ± 1,37	0,60 ± 0,01
Pepsina/Tripsina+Quimotripsina	16,71 ± 2,43	0,40 ± 0,00

Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=3) ± desvio padrão

Comparando os resultados apresentados na TABELA 13, inicialmente, observa-se que os peptídeos liberados tanto pela ação da pepsina / *Streptomyces griseus*, quanto pela pepsina / tripsina + quimotripsina demonstraram uma elevada atividade inibitória. Quando comparadas as ações das enzimas entre si, podemos notar que os peptídeos liberados pelas enzimas pepsina / tripsina + quimotripsina foram mais ativos (IC₅₀ = 0,025 mg proteína/ml) que aqueles obtidos pelo uso das enzimas pepsina / *Streptomyces griseus*.

TABELA 13 – Comparação da atividade inibitória do “minced” hidrolisado com enzimas gastrointestinais e do hidrolisado produzido pela ação das enzimas pepsina / *Streptomyces griseus*

	GH (%)	IC ₅₀ (mg proteína/ml solução)
H _{T1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	34,2	0,040 ± 0,004 ^a
Pepsina / tripsina + quimotripsina	16,7	0,025 ± 0,0001 ^b

Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=4) ± desvio padrão

No decorrer deste trabalho observa-se que quanto maior o grau de hidrólise, maior a liberação de peptídeos anti-hipertensivos, dados estes que corroboram com dados da literatura já citada. Entretanto, apesar do menor grau de hidrólise apresentado pelo “minced” hidrolisado pelas enzimas gastrointestinais, os peptídeos presentes, liberados pela ação dessas,

apresentaram uma atividade inibitória mais potente que os peptídeos liberados pelo sistema pepsinal/ *Streptomyces griseus*.

Embora o grau de hidrólise seja importante para prever a atividade inibitória, como demonstrado anteriormente (**FIGURA 11**), estes resultados indicam que a especificidade das enzimas podem influenciar decisivamente na atividade final.

A pepsina age preferencialmente sobre ligações peptídicas adjacentes aos grupos amino e carboxílicos terminais de aminoácidos aromáticos e aos grupos carboxílicos dos aminoácidos leucina, ácido aspártico e glutamina. Já, a quimotripsina cliva as ligações peptídicas próximas aos grupos carboxílicos dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. A tripsina, por sua vez, atua principalmente, nas ligações peptídicas adjacentes aos grupos carboxílicos dos aminoácidos lisina e arginina.

Visto que a ECA parece preferir substratos ou inibidores competitivos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada), propõe-se que enzimas as quais clivam as ligações peptídicas adjacentes aos grupos carboxílicos desses aminoácidos poderão liberar peptídeos que apresentarão alta afinidade pela ECA.

Os peptídeos liberados pela ação desses dois sistemas enzimáticos devem ser estudados e caracterizados principalmente com relação ao peso molecular e seqüência de aminoácidos, além disso, comparados entre eles para poder explicar detalhadamente a ação inibitória destes sob a ECA.

Em suma, esses resultados indicam que os peixes deste estudo ao serem consumidos, pela ação das enzimas gastrointestinais, poderão liberar peptídeos inibidores da ECA.

Ensaio com a tripsina e quimotripsina

Ao submeter o "minced" ao ensaio de digestibilidade com as enzimas digestivas, tornou-se interessante determinar se alguma enzima, em particular, estaria sendo a responsável pela atividade inibidora da ECA. Um outro ensaio foi realizado para verificar se havia diferenças na liberação de peptídeos bioativos quando se utilizava a tripsina ou a quimotripsina.

A **FIGURA 13** apresenta os resultados obtidos com relação ao grau de hidrólise durante um período de 5 horas de hidrólise. Observa-se que as duas enzimas se comportaram de maneira semelhante; como era esperado; com o aumento do tempo de hidrólise, aumentou o grau de hidrólise.

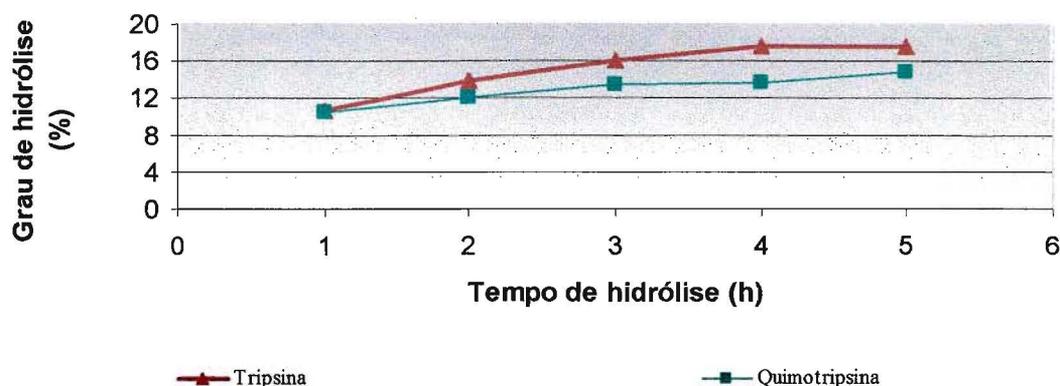


FIGURA 13 – Grau de hidrólise (%) dos hidrolisados obtido a partir do “minced” de tilápia, com as enzimas tripsina e quimotripsina, por um período de cinco horas de hidrólise.

O Efeito do tempo de hidrólise (entende-se também, como grau de hidrólise) sobre a atividade inibitória da ECA é apresentado na **FIGURA 14**. De acordo com esses resultados, a quimotripsina é a principal responsável pela liberação dos peptídeos com maior atividade biológica. Ao final das cinco horas de hidrólise, os peptídeos liberados pela ação desta enzima, apresentaram uma atividade inibitória mais elevada ($IC_{50} = 0,10\mu\text{L/mL}$ solução) do que os liberados pela ação da tripsina ($IC_{50} = 0,37\mu\text{L/mL}$ solução).

Novamente, verificamos que apesar dos hidrolisados obtidos pela ação da tripsina terem apresentado um maior grau de hidrólise, parece que a especificidade da enzima foi um fator determinante. Isso pode ser explicado, já que a quimotripsina cliva as ligações peptídicas próximas aos grupos carboxílicos dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano; os peptídeos contendo estes aminoácidos no grupo carboxílico são preferidos pela ECA, como mencionado anteriormente.

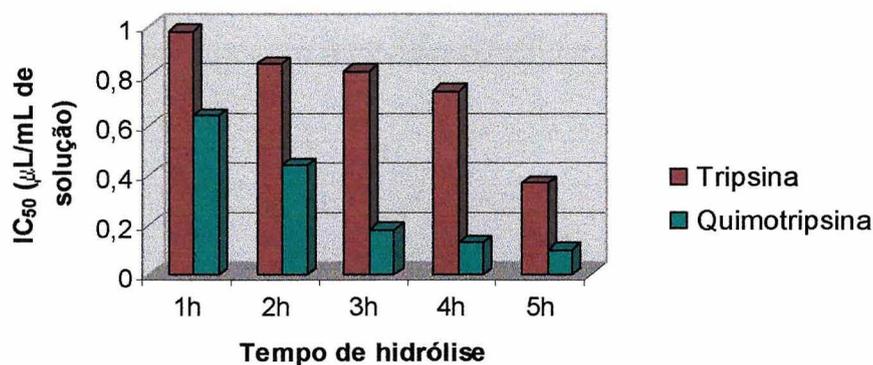


FIGURA 14- Efeito do tempo de hidrólise das proteínas do “minced” de tilápia, com as enzimas tripsina e quimotripsina, sobre a atividade inibitória da ECA

Torna-se necessário, portanto, caracterizar os peptídeos obtidos, quanto ao tamanho molecular e seqüência de aminoácidos, para esclarecer de fato, o porquê da maior atividade dos peptídeos quando liberados pela ação da quimotripsina.

5.9 Fracionamento dos hidrolisados dos “minced” de tilápia e corvina obtidos pelo uso do sistema enzimático pepsina / *Streptomyces griseus* por cromatografia em gel

Cromatografia em gel em colunas empacotada com Sephadex G-15 ou G-25 tem sido bastante utilizada na literatura para fracionar os hidrolisados com o objetivo de isolar as frações contendo atividade inibitória mais alta que o hidrolisado original.

Os hidrolisados dos “minced” de tilápia (H_{T1}) e corvina (H_{C1}), obtidos pelo uso do sistema enzimático pepsina / *Streptomyces griseus*, foram fracionados com o intuito de detectar as frações contendo atividades inibitórias mais altas. Para tanto, os hidrolisados foram submetidos a uma separação das frações por cromatografia em resina Sephadex G-15 e/u G-25. A eluição foi monitorada a 254 nm.

O H_{T1} foi eluído inicialmente em uma coluna empacotada com Sephadex G-25 e ao todo foram coletadas 55 frações, como pode ser visto na **FIGURA 15**. As frações correspondentes aos sete picos foram agrupadas, liofilizadas,

ressuspensas em água deionizada e denominadas frações HT I a VII. Todas as frações foram analisadas quanto à atividade inibidora da ECA.

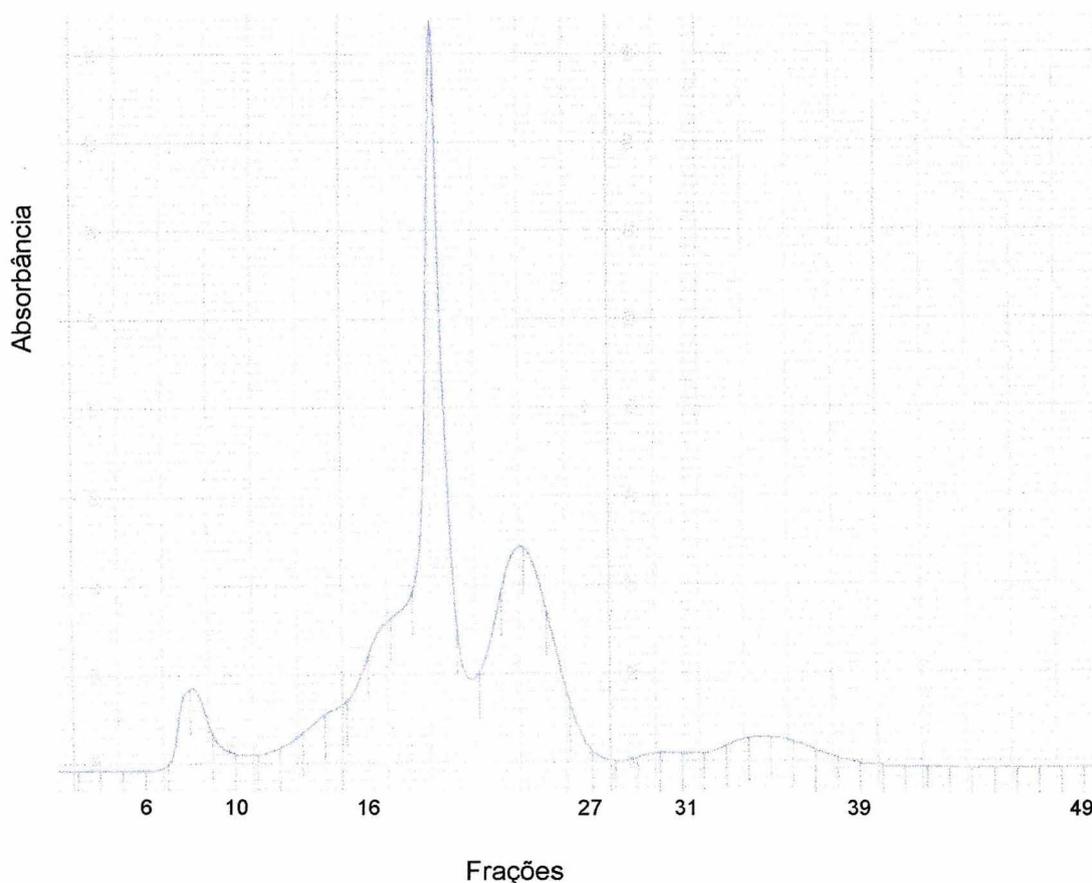


FIGURA 15 - Perfil cromatográfico do hidrolisado de peixe tilápia (pepsina / protease de *Streptomyces griseus*) H_{T1}, em coluna empacotada com Sephadex G-25

O valor IC₅₀ foi expresso em função da quantidade de volume (μL) de cada fração necessária para inibir 50% da atividade da enzima.

As frações HT II, HT III, HT IV e HTVII apresentaram valores IC₅₀ igual a 0,004, 0,006, 0,004 e 0,004 μL de fração / mL de solução, respectivamente, sendo consideradas as frações com atividade inibitória mais elevada, como pode ser observado na **FIGURA 16**.

Pelo fato da separação com Sephadex G-25 não ter sido satisfatória, o mesmo hidrolisado foi submetido a uma separação em gel Sephadex G-15, **FIGURA 17**. Houve uma separação melhor das frações peptídicas, aumentando-se o número de frações coletadas para 12, denominadas de

HT/G15 I a XII. As frações I, VI, VIII, X e XI apresentaram menor atividade inibitória quando comparadas as demais frações (**FIGURA 18**).

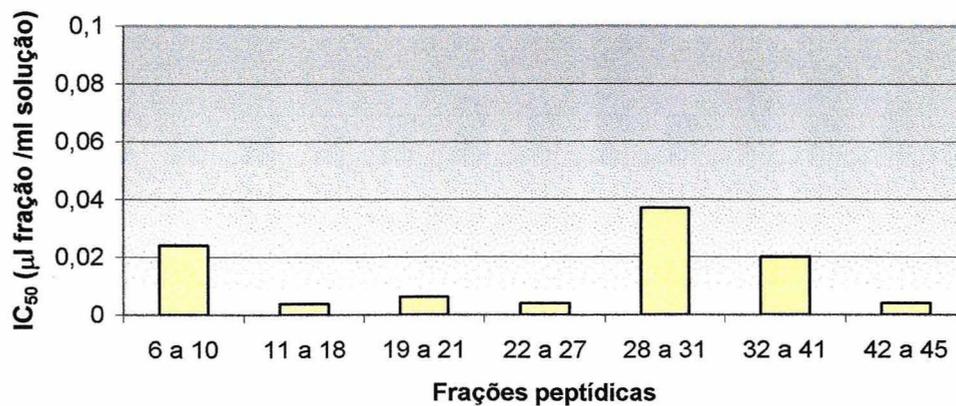


FIGURA 16 – Atividade inibitória das frações peptídicas do H_{T1}, expressa como IC₅₀, obtidas após cromatografia em gel Sephadex G-25

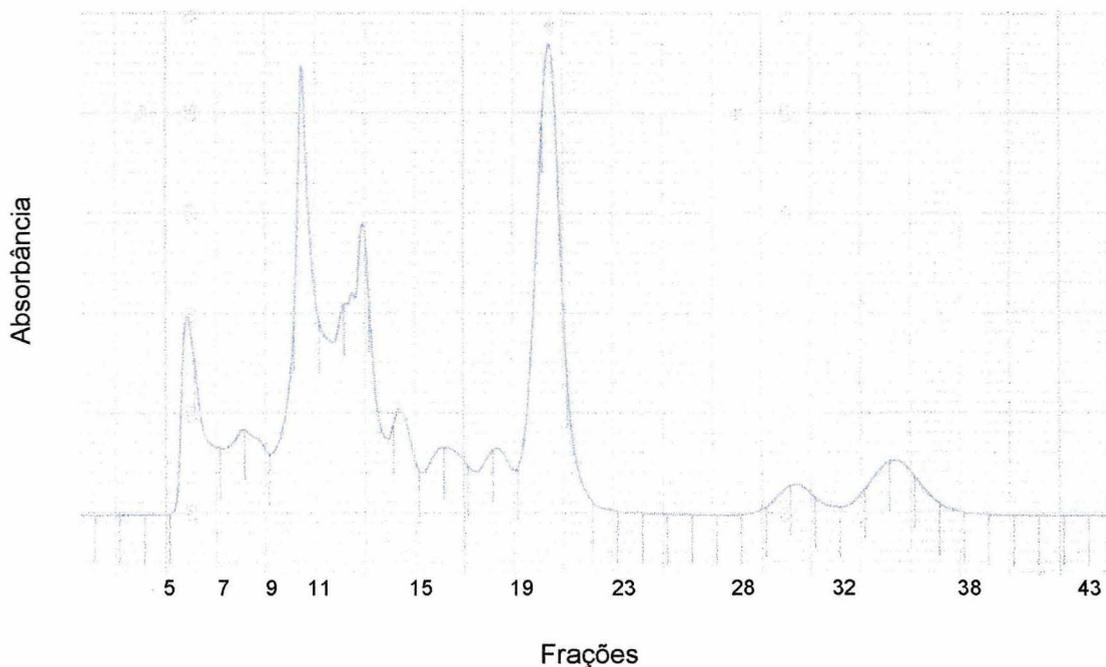


FIGURA 17 - Perfil cromatográfico do hidrolisado de peixe tilápia (pepsina / protease de *Streptomyces griseus*) H_{T1}, em coluna empacotada com Sephadex G-15

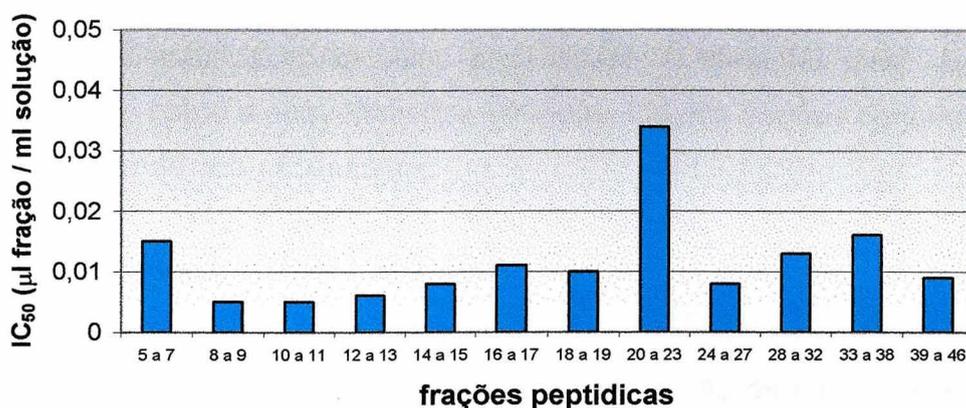


FIGURA 18 – Atividade inibitória das frações peptídicas do H_{T1}, expressa como IC₅₀, obtidas após cromatografia em gel Sephadex G-15

Com base nesses resultados, conclui-se que o fracionamento utilizando Sephadex G-15 poderá ser utilizado em futuras separações das frações peptídicas dos hidrolisados, por fornecer frações peptídicas relativamente bem separadas, principalmente quando se deseja caracterizar os peptídeos com a maior atividade inibitória. Analisando os resultados, também, foi observado que todas as frações apresentaram atividade inibitória, não sendo encontrada frações sem atividade. A diferença encontrada entre estas frações peptídicas está relacionada somente a maior ou menor capacidade de inibir a ECA.

Procedimento semelhante foi realizado com o hidrolisado do peixe corvina, onde o H_{C1} também foi submetido à separação das frações por cromatografia em resina Sephadex G-25, sendo a eluição monitorada à 254 nm e no total foram coletadas 45 frações, como pode ser visto na **FIGURA 19**. As frações correspondentes aos 6 picos, denominadas de HC I a VI, foram agrupadas, liofilizadas, ressuspensas em água deionizada e analisadas quanto à atividade inibidora da ECA.

A fração HC II (12 a 20) apresentou um valor IC₅₀ igual a 0,003μL/mL solução, sendo considerada a fração com a maior atividade inibitória, como demonstrado na **FIGURA 20**.

O H_{C1} foi submetido à separação das frações por Sephadex G-15, onde também foi observada uma melhor separação das frações (dados não apresentados). Além disso, da mesma forma que os hidrolisados obtidos a partir da tilápia, após o fracionamento em gel Sephadex G-15, todas as frações

apresentaram atividade inibitória. Dessa forma, nenhuma fração deverá ser descartada, e estudos conclusivos para definir o tamanho ideal da cadeia peptídica, bem como a sequência dos aminoácidos das frações contendo maior atividade inibitória são necessários.

Cálculo do valor IC₅₀

Os métodos para determinação da concentração de proteínas totais são muito variados e não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios, no entanto, as metodologias mais empregadas são as espectrofotométricas no ultra-violeta e no visível (UV-Vis). Os métodos mais utilizados são o do biureto, Lowry, do "Coomassie brilliant blue" BG-250 ou reagente de Bradford, do BCA ou reagente de Smith, e de absorção de proteínas no ultravioleta (STOSCHECK, 1990; SMITH *et al.*, 1985; BRADFORD, 1976; LOWRY *et al.*, 1951; GORNALL, BARDAWILL e DAVID, 1949).

Em análises anteriores, o valor do IC₅₀ das frações peptídicas foi expresso em função da quantidade de proteína (μg)/ mL de solução, calculada utilizando a metodologia descrita por BRADFORD (1976), com algumas modificações. Porém, no decorrer das análises dos resultados, observou-se que essa metodologia não era a mais adequada, pois não era possível determinar com precisão a quantidade real de proteína nas frações, devido a uma de suas limitações: baixa sensibilidade quando a amostra possui peptídeos de baixo peso molecular.

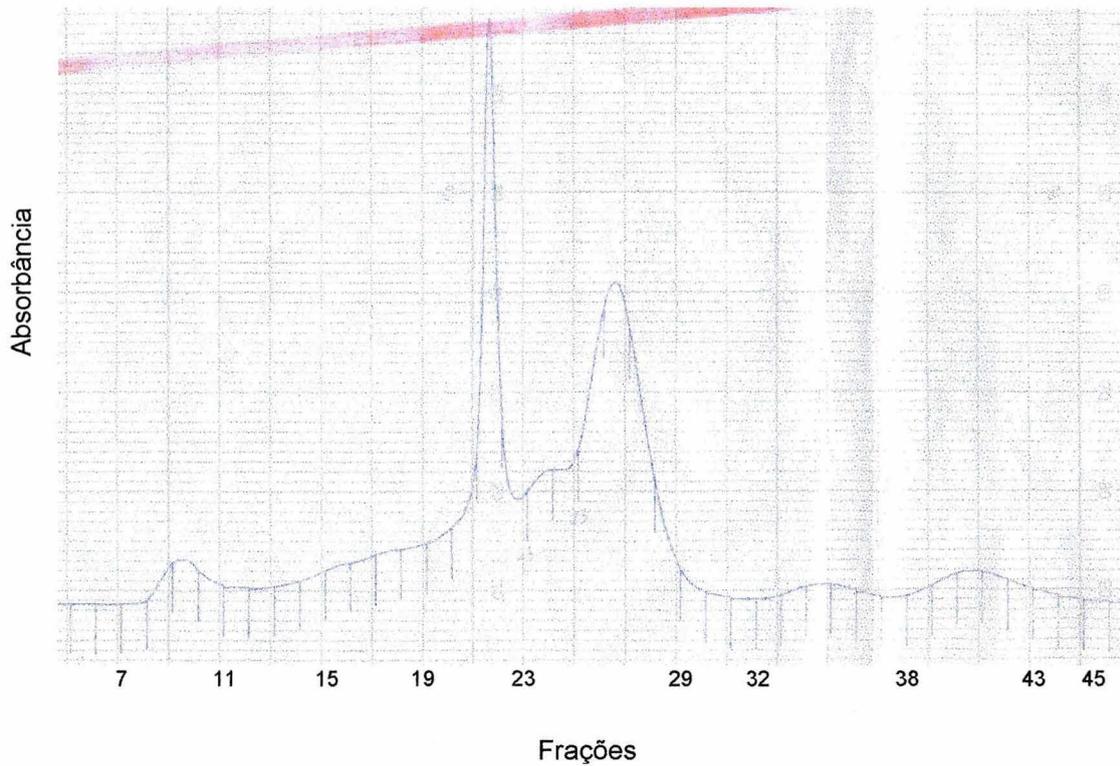


FIGURA 19 - Perfil cromatográfico do hidrolisado de peixe corvina (pepsina / protease de *Streptomyces griseus*) H_{C1}, em coluna empacotada com Sephadex G-25.

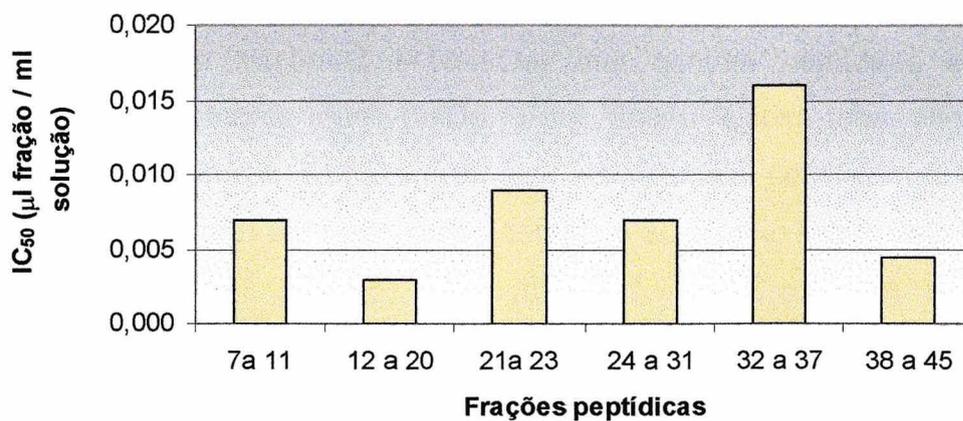


FIGURA 20 - Atividade inibitória das frações peptídicas do H_{C1}, expressa como IC₅₀, obtidas após cromatografia em gel Sephadex G-25

5.10 Fracionamento do hidrolisado utilizando membranas de ultrafiltração

Os hidrolisados dos “minced” de tilápia e corvina com a ação da pepsina/*Streptomyces griseus* foram separados de acordo com o peso molecular dos peptídeos presentes, utilizando membranas de ultrafiltração. Cada fração foi testada quanto à atividade inibidora da ECA.

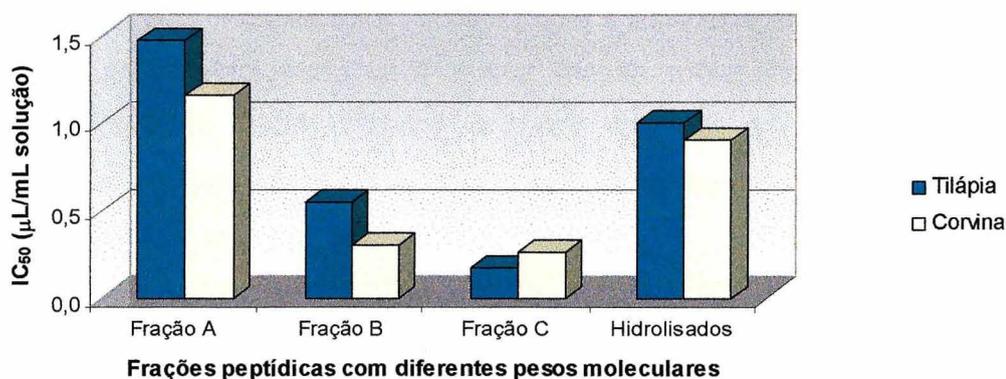


FIGURA 21 - Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de corvina e tilápia com pepsina/*Streptomyces griseus* e de suas respectivas frações A (> 30kDa), B (10 a 30kDa) e C (< 10kDa) obtidas dos hidrolisados.

Como pode ser observado na **FIGURA 21**, a maior atividade inibitória correspondeu à fração C (<10 kDa) que contém peptídeos com pesos moleculares menores que 10kDa. Esta fração exibiu uma alta atividade inibitória tanto para o H_{T1} (IC₅₀ = 0,17µL/ mL solução), como para o H_{C1} (IC₅₀ = 0,26µL/mL solução) em relação aos demais e ao próprio hidrolisado de origem, H_{T1} (IC₅₀ = 1µL/mL solução) e H_{C1} (IC₅₀ = 0,9µL/mL solução). Esses dados corroboram com os dados encontrados na literatura que atribuem aos peptídeos de baixo peso molecular, geralmente representados por di e tripeptídeos, uma maior atividade inibitória (HYUN & SHIN, 2000; YAMAMOTO, MAENO e TAKANO, 1999; JEON, BYUN, KIM, 1999; MATSUI *et al.*, 2002; YOKOYAMA *et al.*, 1992).

Apesar da fração A, contendo peptídeos com peso molecular maior que 30kDa, ter apresentado uma baixa atividade inibitória (IC₅₀ = 1,47 e 1,15µL/mL solução, para os hidrolisados de tilápia e corvina, respectivamente), após

administração oral por animais SHR, pode exercer um efeito contrário. KINOSHITA, YAMAKOSHI e KIKUCHI (1993) obtiveram duas diferentes frações de alto e baixo peso molecular, a partir da purificação de um extrato de soja, por cromatografia de filtração em gel. A fração contendo peptídeos com alto peso molecular reduziu a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos, enquanto a de baixo peso molecular não diminuiu a pressão arterial.

A habilidade de inibir a ECA em ensaios "in vitro" é apenas um indicativo de uma possível ação hipotensora "in vivo", pois a atividade inibitória do inibidor nem sempre está relacionada com a sua massa molecular (FITZGERALD, MURRAY e WALSH, 2004). Porém, ensaios "in vivo" de inibição da ECA dessas três frações peptídicas devem ser realizados, para confirmar a atividade anti-hipertensiva dessas frações.

Além da massa molecular dos peptídeos, a digestão gastrointestinal é de grande importância na biodisponibilidade dos peptídeos inibidores da ECA, onde as proteases gastrointestinais podem aumentar ou diminuir sua atividade, devido a liberação de peptídeos com diferentes seqüências de aminoácidos na cadeia (VERMEIRSEN *et al.*, 2003).

Tem sido bastante discutido, também, além da seqüência de aminoácidos da cadeia peptídica, o tamanho desta cadeia, pois acredita-se que exista um tamanho ideal para que os substratos e inibidores da ECA possam se ligar a mesma. Parece que aminoácidos livres não são capazes de inibir a ECA, bem como os peptídeos com elevado tamanho molecular, onde neste caso poderia haver um impedimento estérico, não possibilitando a ligação da enzima com os seus substratos ou inibidores.

Entretanto, a separação por membrana de ultrafiltração mostrou-se útil, por ser um processo preliminar de purificação da fração contendo peptídeos com elevada atividade inibidora.

5.11 Atividade inibitória dos hidrolisados de “minced” de tilápia e corvina obtidos pelo processo de autólise

MATSUMURA *et al.*, 1993^{a,b} descreveram que as próprias enzimas proteolíticas constituintes do peixe podem clivar a proteína muscular liberando peptídeos bioativos. Portanto, para ver se o mesmo acontecia com os “minced” dos peixes tilápia e corvina, foram realizados ensaios avaliando a produção de peptídeos bioativos pelo processo de autólise. Os valores IC₅₀ foram calculados em função do volume de hidrolisado necessário para inibir 50% a atividade e os resultados estão representados na TABELA 14.

TABELA 14 – Atividade inibitória dos hidrolisados de tilápia, H_{T1} e H_{C1} e dos hidrolisados obtidos pelo processo de autólise, A_T (autólise tilápia) e A_C (autólise corvina)

Hidrolisado	IC ₅₀ (μL hidrolisado/ml)
H _{T1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	1,0
H _{C1} – pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	0,9
A _T – Autólise tilápia	18,0
A _C – Autólise corvina	15,0

Resultados correspondem à média dos valores obtidos (n=2)

Os peptídeos obtidos pelo processo de autólise do “minced” da tilápia (A_T) e da corvina (A_C) demonstraram um IC₅₀ igual a 18μL hidrolisado / ml e 15μL hidrolisado / ml, respectivamente, indicando que as enzimas endógenas presentes nesses peixes são capazes de liberar pequenas quantidades de peptídeos com atividade biológica, em relação aos hidrolisados.

6 CONCLUSÕES

- Os hidrolisados obtidos a partir dos peixes Tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus* – linhagem tailandesa) e Corvina (*Micropogonias furnieri*) são fontes de peptídeos inibidores da ECA, podendo em potencial, auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão;
- A metodologia descrita para medir a atividade inibitória dos peptídeos bioativos foi empregada com sucesso para medir a atividade inibitória dos hidrolisados de peixe;
- A liberação dos peptídeos inibidores da ECA está relacionada tanto com o grau de hidrólise como com a especificidade das enzimas utilizadas;
- Os peptídeos presentes no hidrolisado mantêm a sua estabilidade quando submetidos à ação das enzimas gastrointestinais “in vitro”;
- A inibição da ECA pelos peptídeos inibidores se dá tanto pela ligação dos peptídeos ao domínio C, como ao domínio N da ECA, porém, os melhores resultados de inibição ocorreram quando os peptídeos se ligaram a ambos os domínios da enzima;
- O “minced” de tilápia quando hidrolisado por enzimas gastrointestinais também liberou peptídeos com atividade inibitória; assim, o consumo deste peixe poderá eventualmente auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão;
- Tanto o fracionamento utilizando gel Sephadex G-15, como membranas de exclusão por peso molecular poderão ser utilizados em futuras separações das frações peptídicas dos hidrolisados, quando se desejar isolar frações peptídicas contendo atividades inibitórias mais elevadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chem.**, v.58, n.4, p.355-359, 1997.
2. AMENTA, F., DI TULLIO, M.A., TOMOSSONI, D. Arterial hypertension and brain damage- Evidence from animal models (review). **Clin. Exp. Hypert.**, v.25, p.359-380, 2003.
3. ANDRADE, J.P., VILAS-BOAS, F., CHAGAS, H., ANDRADE, M. Aspectos epidemiológicos da aderência ao tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.79, n.4, p.375-379, 2002.
4. ARAUJO, M.C., MELO, R.L., CESARI, M.H., JULIANO, M.A., JULIANO, L., CARMONA, A.K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v.39, p.8519-8525, 2000.
5. ARAUJO, M.C., MELO, R.L., DEL NERY, E., ALVES, M.F.M., JULIANO, M.A., CASARINI, D.E., JULIANO, L., CARMONA, A.K. Internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme. **J. Hypert.**, v.17, p.665-672, 1999.
6. ARIHARA, K., NAKASHIMA, Y., MUKAI, T., ISHIKAWA, S., ITOH, M. Peptide inhibitors for angiotensin I -converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. **Meat Science**, v.57, p.319-324, 2001.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1995. Official methods of analysis. 16.ed. Arlington: AOAC.
8. ASTAWAN, M., WAHYUNI, M., YASUHARA, T., YAMADA, K., TADOKORO, T., MAEKAWA, A. Effect s of angiotensin i-converting enzyme-inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood-pressure of rats. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.59, n.3, p.425-429, 1995.
9. ATKINSON, A. B., ROBERTSON, J. I. S. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac-failure. **LANCET**, v.2, n.8147, p.836-839, 1979.
10. BÁRZANA E, GARIBAY-GARCÍA M. 1994. Production of fish protein concentrates. In: MARTIN, A.M. **Fisheries processing: biotechnological applications**. London: Chapman&Hall. p.206-222.
11. BAUTISTA, J., HERNANDEZ-PINZON, I., ALAIZ, M., PARRADO, J., MILLAN, F. Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, n.4, p.967-971, 1996.

12. BERLIN, J. A., COLDITZ, G. A. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary hearth disease. **Am. J. Epidemiol.**, v.132, v.4, p.612-628, 1990.
13. BERNSTEIN, K.E., MARTIN, B.M., EDWARDS, A.S., BERNSTEIN, E.A. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. **J. Biol. Chem**, v.264, p.11945-11951, 1989.
14. BIOLLAZ, J., BURNIER, M., TURINI, G. A., BRUNNER, D. B., PORCHET, M., GOMEZ, H. J., JONES, K. H., FERBER, F., ABRAMS, W. B., GAVRAS, H., BRUNNER, H. R. Three new long-acting converting-enzyme inhibitors - relationship between plasma converting-enzyme activity and response to angiotensin-I. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.29, n.5, p.665-670, 1981.
15. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitatin of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
16. BRANTL, V., TESCHEMACHER, H., BLÄSIG, J., HENSCHEN, A., LOTTSPEICH, F. Opioid activities of β -casomorphins. **Life Sci.**, v.28, p.1903-1909, 1981.
17. BUSNELLO, R. G., MELCHIOR, R., FACCIN, C., VETTORI, D., PETTER, J., MOREIRA, L. B., FUCHS, F. D. Características associadas ao abandono do acompanhamento de pacientes hipertensos atendidos em um ambulatório de referência. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.76, n.5, p.349-51, 2001.
18. BYUN, H-G., KIM, S-K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. **Process Biochem.**, v.36, p.1155-1162, 2001.
19. CALDERÓN DE LA BARCA, A.M., RUIZ-SALAZAR, R.A., JARA-MARINI, M.E. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to imprpove its amino acid composition and functional properties. **J. Food Sci.**, Chicago, v.65, n.2, p.246-253, 2000.
20. CHANG, K.J., KILLIAN, A., HAZUM, E., CUATRECASAS, P. Morphiceptin: a potent and specific agonist for morphine (μ) receptors. **Science**, v.212, p.75-77, 1981.
21. CHEUNG, H.S., CUSHMAN, D.W. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. **Biochem. Biophy. Acta**, v.293, p.451-463, 1973.
22. CHEUNG, H.S., WANG, F.L., ONDETTI, M.A., SABO, E.F., CUSHMAN, D.W. Binding of peptide substrate and inhibition of angiotensin-converting enzyme: importance of the COOH-terminal dipeptides sequence. **J. Biol. Chem.**, v.255, p.401-407, 1980.

23. CHOI, H.S., CHO, H.Y., YANG, H.C., RA, K.S., SUH, H.J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. **Food Res. Inter.**, v.34, p.177-182, 2001.
24. Criar e Plantar Disponível em: http://criareplantar.com.br/pecuaria/peixe/especie_mar.php?tipoConteudo=texto&idConteudo=1074. Acesso em: 01 mai. 2004.
25. CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H.S. 1972. Studies in vitro of angiotensin-converting enzyme of lung and other tissues. **Hypertension**. New York:Springer. p.532-541.
26. CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H.S. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. **Biochem. Biophys. Acta**, v.250, p.261-265, 1971b.
27. CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v.20, p.1637-1648, 1971a.
28. DE MIRA, NVM. 2001. **Utilização de surimi para a obtenção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, Brasil, número de páginas.
29. DINIZ, F.M., MARTIN, A.M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 48, p.191-200, 1997.
30. DIVE, V., COTTON, J., YIOTAKIS, A., MICHAUD, A., VASSILIOU, S., JIRACEK, J., VAZEUX, G., CHAUVET, M-T., CUNIASSE, P., CORVOL, P. **RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites**. Proc. Natl. Acad. Sci., v.96, n.8, p. 4330-4335, 1999.
31. EL-DORRY, H.A., BULL, H.G., IWATA, K., THORNBERRY, N.A., CORDLES, E.H., SOFFER, R.L. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidases. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.14128-14133, 1982.
32. ELISSEEVA, Y.E., OREKHOVICH, V.N., PAVLIKHINA, L.T., ALEXEENKO, L.P. Carboxycathepsin – a key regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure. **Clin. Chim. Acta**, v.31, p.413-419, 1971.
33. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fishery Country Profile**. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/highligh/worddpr/x281e.asp>. Acesso em 13 de setembro de 2002.
34. FAO. Summary information on the role of international fishery and other bodies with regard to the conservation and management of living resources of the high seas. Roma, 1996. 104p.

35. FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops Jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v.24, p.163-169, 1965.
36. FERREIRA, S.H., BARTELT, D.C., GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v.9, p.2583-2593, 1970.
37. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v.226, p.407-509, 1957.
38. FREITAS, O. C., CARVALHO, F. R., NEVES, J. M., VELUDO, P. K., PARREIRA, R. S., GONÇALVES, R. M., DE LIMA, S. A., BESTETTI, R. B. Prevalência da hipertensão arterial sistêmica na população urbana de Catanduva, SP. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.77, n.1, p.9-15, 2001.
39. FRIEDLAND, J., SILVERSTEIN, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **A.J.C.P.**, v.66, p.416-424, 1976.
40. FUJITA, H., YAMAGAMI, T., OHSHIMA, K. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in boderline and mildly hypertensive subjects. **Nutr. Res.**, v.21, p.1149-1158, 2001.
41. FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – FIPERJ. Disponível em: <http://www.fiperj.rj.gov.br/pmar.html>. Acesso em: 01 mai. 2004.
42. GEORGIADIS, D., BEAU, F., CZARNY, B., COTTON, J.; YIOTAKIS, A., DIVE, V. Roles of the Two Active Sites of Somatic Angiotensin-Converting Enzyme in the Cleavage of Angiotensin I and Bradykinin: Insights From Selective Inhibitors. **Circ. Res.**, v.93, n.2, p.148-154, 2003.
43. GERHARTZ, W. Enzymes in industry. Production and applications. Basel (Switzerland). VCH:321p. 1990.
44. GILDBERG, A.; BØGWALD, J., JOHANSEN, A., STENBERG, E. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.114b, n.1, p.97-101, 1996.
45. GILL, I., LÓPEZ-FANDIÑO, R., JORBA, X., VULFSON, E.N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.162-183, 1996.
46. GUYTON, A.C. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphics models. **Am. J. Physiol.**, v.259, p.R865-R877, 1990.

47. GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014 p.
48. GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 10ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 1064p.
49. HOLLEMANS, H.J.G., DER MEER, J.V., KLOOSTERZIEL, W. Identification of the incubation product of Boucher's renin activity assay, by means of radioimmunoassays for angiotensin I and angiotensin II, and a converting enzyme preparation from lung tissue. **Clin. Chim. Acta**, v.23, p.7-15, 1969.
50. HÖLLT, V. Multiple endogenous opioid peptides. **Trends in neuroscience**, v.6, p.24-26, 1983.
51. HOU, W-C; CHENG, H-J; LIN, Y-H. Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.6, p.1706-1709, 2003.
52. HUBERT, C., HARROT, A.M., CARROL, P., SOUBRIER, F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoter correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **J. Biol. Chem.**, v.266, 15377-15383, 1991.
53. HUGGINS, C.G., THAMPI, N.S. A simple method for the determination of angiotensin I converting enzyme. **Life Science**, v.7, parte II, p.633-639, 1968.
54. HYUN, CK; SHIN, HK. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v.36, p.65-71, 2000.
55. JASPARD, E., WEI, L., ALHENC-GEBAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). **J. Biol. Chem.**, v.268, n.13, p.9496-9503, 1993.
56. JEON, Y.J., BYUN, H.G., KIM, S.K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochem.**, Shannon, v.35, p.471-478, 1999.
57. JNC 6. **The sixth report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure**. NIH publication, nov. 1997.
58. JNC 7. **The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure**. NIH publication, n.03-5233, may. 2003.
59. JUNIOR, D.M., PIERIN, A.M.G., LESSA, I., NOBRE, F. Aparelhos, técnicas de medida da pressão arterial e critérios de hipertensão adotados por médicos brasileiros. Estudo exploratório. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.79, n.6, p.593-596, 2002.

60. KAPLAN, N.M. Evidence in favor of moderate dietary sodium reduction. *Am. J. Hypertension*, v.13, p.8-13, 2000.
61. KINOSHITA, E., YAMAKOSHI, J., KIKUCHI, M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.57, n.7, p.1107-1110, 1993.
62. KOHAMA, Y., OKA, H., KAYAMORI, Y., TSUJIKAWA, K., MIMURA, T., NAGASE, Y., SATAKE, M. Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric. Biol. Chem.*, v.55, n.8, p.2169-2170, 1991.
63. LAHL, W.J., BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, Chicago, v.48, n.10, p.68-71, 1994.
64. LEATHERBARROW, R.J. *Grafit version 5.0*. Staines, UK: Erithacus Software Ltd., 1992.
65. MADRID, R.M. Avança Brasil: Programa de desenvolvimento da aquicultura. In: Seminário e Workshop "Tecnologia para aproveitamento do pescado integral do pescado", Campinas, 2000. Resumos. Campinas: ITAL, 2000. P.1-4.
66. MAENO, M., YAMAMOTO, N., TAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.1316-1321, 1996.
67. MARUYAMA, S., MITACHI, H., AWAYA, J., KURONO, M., TOMIZUKA, N., SUZUKI, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of L_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.*, v.54, p.2557-61, 1987.
68. MATSUFUJI, H.; MATSUI, T.; SEKI, E.; OSAJIMA, K.; NAKASHIMA, M.; OSAJIMA, Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.58, n.12, p.2244-2245, 1994.
69. MATSUI, T., MATSUFUJI, H.; OSAJIMA, Y. Colorimetric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56, n.3, p.517-518, 1992.
70. MATSUI, T.; YUKIYOSHI, A., DOI, S., SUGIMOTO, H., YAMADA, H., MATSUMOTO, K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutr. Biochem.*, v.13, p.80-86, 2002.
71. MATSUMURA, N., FUJII, M., TAKEDA, Y., SUGITA, K., SHIMIZU, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.57, n.5, p.695-697, 1993.

72. MEISEL, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. **Livestock Production Science**, v.50, p.125-138, 1997.
73. MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptide. **Int. Dairy J.**, p.363-373, 1998.
74. MEISEL, H., SCHLIMME, E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. **Trends Food Sci. Technol.**, v.2, p.41-43, 1990.
75. MELLANDER, O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. Apud.: LEPPÄLÄ, A. P. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends Food Sci.**, v.11, p.347-356, 2001.
76. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. http://www.setorpesqueiro.com.br/ministerios/ministerio_da_agricultura_e_do_abastecimento/index_.asp. Acesso em: 10 dez. 2001.
77. MINISTÉRIO DA MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL. Os ecossistemas brasileiros e os principais macrovetores de desenvolvimento - subsídios ao Planejamento da gestão ambiental. **Projeto Cenários para o Planejamento da Gestão Ambiental**. Brasília - DF. p.1-15, 1995.
78. MIYOSHI, S., ISHIKAWA, H., KANEKO, T., FUKUI, F., TANAKA, H., MARUYAMA, S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme-inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.5, p.1313-1318, 1991.
79. MOREY, 1982
80. MS/SPS. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sps/areastecnicas/cnhd/apresentacao/home.htm>. Acesso em: 10 dez. 2004.
81. MS/SVS/DASIS. Sistema de Informações sobre mortalidade – SIM. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtuf.def>. Acesso em: 8 dez. 2003.
82. MULLALLY, M. M., MEISEL, H., FITZGERALD, R. J., Identification of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding activity to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin. **FEBS Letters**, v.402, p.99-101, 1997.
83. MULLALLY, M. M., MEISEL, H., FITZGERALD, R. J., Synthetic peptides corresponding to L-lactalbumin and L-lactoglobulin sequences with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v.377, p.259-260, 1996.

84. NG, K.K.F., VANE, J.R. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. **Nature**, v.216, p.762-766, 1967.
85. NG, K.K.F., VANE, J.R. Fate of angiotensin I in the circulation. **Nature**, v.218, p.144-150, 1968.
86. ONDETTI, M.A., CUSHMAN, D.W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. **Ann. Rev. Biochem.**, v.51, p.283-308, 1982.
87. ONDETTI, M.A., RUBIN, B., CUSHMAN, D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, v.196, p.441-444, 1977.
88. ONDETTI, M.A., WILLIAMS, N.J., SABO, E.F., PLUVEC, J., WEAVER, E.R., KOCY, O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*: isolation, elucidation of structure and synthesis. **Biochem.**, v.10, p.4033-4039, 1971.
89. ONDETTI, M.A., PLUSCEC, J., SABO, E.F., WILLIAMS, N.J., WEAVER, E.R., KOCY, O. Angiotensin converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. **Biochem.**, v.10, p.4033-4039, 1971.
90. OPARIL, S., ZAMAN, M.A., CALHOUN, D.A. Pathogenesis of Hypertension. **ACP**, v.139, p.761-776, 2003.
91. OSHIMA, G., SHIMABUKURO, H., NAGASAWA, K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. **Biochem. Biophys. Acta**, v.566, p.128-137, 1979.
92. PAFFENBARGER, R.S. Review: Contributions of epidemiology to exercise science and cardiovascular health. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.20, n.5, p.426-438, 1988.
93. PATCHETT, A.A., HARRIS, E., TRISTA, E.W., WYVRATT, M.J., WU, M.T., TAUB, D., PETERSON, E.R., IKCLER, T.J., BROEKE, J.T., PAYNE, L.G., ONDEYKA, D.L., THORSETT, E.D., GREENLEE, W.J., LOHR, N.S., HOFFSOMMER, R.D., JOSHA, H., RUYLE, W.V., ROTHROCK, J.W., ASTER, S.D., MAYCOCK, A.L., ROBISON, F.M., HIRSCHMANN, R. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Nature**, v.288, p.280-283, 1980.
94. PEREA, A., UGALDE, U., RODRIGUEZ, I., SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey bioconversion processes. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.15, p.418-423, 1993.
95. PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends Food Sci. Technol.**, v.11, p.347-356, 2001.

96. POULIOT, Y., WIJERS, M.C., GAUTHIER, S.F., NADEAU, L. Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.158, p.105-114, 1999.
97. PROPESQ/INSTITUTO DE PESCA (2002). Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br/estatistica.php?source=1>. Acesso:01 mai. 2004
98. REZENDE, D.F., SCARPELLI, R.A. B., SOUZA, G.F., COSTA, J.O., SCARPELLI, A. M.B., SCARPELLI, P.A., CARVALHO, G.B., DÁGOSTINI, H.M., PEDROSA, J.C. Prevalência da Hipertensão arterial sistêmica em escolares de 7 a 14 anos do município de Barbacena, Minas Gerais, em 1999. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.81, n.4, p.375-380, 2003.
99. ROHRBACH, M.S., WILLIAMS, E.B., ROLSTAD, R.A. Purification and substrate specificity of bovine angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.256, p.225-230, 1981.
100. ROSE, G. Preventive cardiology: What lies ahead? **Preventive Med.**, v.19, p.97-104, 1990.
101. ROSS, M. Treatment of hypertension - review necessary after screening. **Brit. Med. J.**, v.292, n.6517, p.384-384, 1986.
102. ROTH, M., WEITZMAN, AF., PIQUILLOUD, Y. Converting enzyme content of different tissues of the rat. **Experientia**, v.25, p.1247, 1969.
103. SAIGA, A., OKUMURA, T., MAKIHARA, T., KATSUTA, S., SHIMIZU, T., YAMADA, R., NISHIMURA, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.6, 1741-45, 2003
104. SBH/SBC/SBN. IV Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. 2002.
105. SCHECHTER, I., BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.27, p.157-162, 1967.
106. SKEGGS, 1964.. **Canadian Med. Assoc., J.**, v.90, p.185-189, 1964.
107. SKEGGS, L.T., KAHN, J.R., SHUMWAY, N.P. The purification of hypertensin II. **J. Exp. Med.**, v.103, p.301-307, 1956.
108. SKEGGS, L.T., KAHN, J.R., SHUMWAY, N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J. Exp. Med.**, v.103, p. 295-299, 1956.
109. SKEGGS, L.T., KAHN, J.R., SHUMWAY, N.P. Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J. Exp. Med.**, v.103, p.295-299, 1956.

110. SKEGGS, L.T., MARSH, W.H., KAHN, J.R., SHUMWAY, N.P. The existence of two forms of hypertensin. **J. Exp. Med.**, v.99, p. 275-282, 1954.
111. SOFFER, R.L. **Angiotensin converting enzyme**. In: SOFFER, R.L. ed. *Sons. Biochemical Regulation of Blood Pressure*, John Wiley&Sons, New York, 1981, p.123-164.
112. SOUBRIER, F., ALHENC-GELAS, F., HUBERT, C., ALLEGRINI, J., JOHN, M., TREGEAR, G., CORVOL, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.85, p.9386-9390, 1988.
113. SPERANDIO, 2002 . Internet
114. TURNER, A.J., HOOPER, N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family; genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci**, v.23, p.177-183, 2002.
115. VERMEIRSSSEN, V., VAN CAMP, J., DEVOS, L., VERSTRAETE, W. Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.19, p.5680-5687, 2003.
116. WAKO, Y., ISHIKAWA, S., MURAMOTO, K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.60, n.8, p.1353 - 55, 1996.
117. WEI *et al* (1992)
118. WEI, L., ALHENC-GELAS, F., CORVOL, P., CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin _-converting enzyme are both catalytacally active. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9002-9008, 1991.
119. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity, preventing and managing the global epidemic. WHO/NUT/NCD 98.1. Genebra, Jun. 1997.
120. WU, J., DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Res. Int.**, v.35, p.367-375, 2002.
121. YAMAMORI, Y. The model and its relation to human essential hypertension. In: **Cardiology1: Hypertension**. London: Butterwork Scientific, 1988. P.57-77.
122. YAMAMOTO, N., MAENO, M., TAKANO, T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. **J. Dairy Sci.**, v.82, p.1388-1393, 1999.
123. YANG, H.Y.T., ERDÖS, E.G., LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactives bradykinin. **Biochem. Biphis. Acta**, v.214, p.374-376, 1970.

124. YOKOYAMA, K., CHIBA, H., YOSHIKAWA, M. Peptide inhibitors for angiotensin-i-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. **Biosc. Biotech. Biochem.**, v.56, n.10, p.1541-1545, 1992.