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

**Avaliação do potencial de formação de peptídeos inibidores da enzima
conversora da angiotensina I a partir de hidrolisados proteicos de amêndoas de
cupuaçu fermentadas**

SABRINA GRIZZI DE OLIVEIRA

SÃO PAULO
2017

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

**Avaliação do potencial de formação de peptídeos inibidores da enzima
conversora da angiotensina I a partir de hidrolisados proteicos de amêndoas de
cupuaçu fermentadas**

SABRINA GRIZZI DE OLIVEIRA

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências dos Alimentos.

Área de concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento.

SÃO PAULO
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48a	<p>Oliveira, Sabrina Grizzi de</p> <p>Avaliação do potencial de formação de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I a partir de hidrolisados proteicos de amêndoas de cupuaçu fermentadas / Sabrina Grizzi de Oliveira. - São Paulo, 2017.</p> <p>93 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Nascimento, Joao Roberto Oliveira do</p> <p>1. Bioquímica dos Alimentos . 2. Cupuaçu. 3. Peptídeos Bioativos. I. T. II. Nascimento, Joao Roberto Oliveira do , orientador.</p>
------	---

SABRINA GRIZZI DE OLIVEIRA

Avaliação do potencial de formação de peptídeos inibidores da enzima
conversora da angiotensina I a partir de hidrolisados proteicos de amêndoas de
cupuaçu fermentadas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
orientador/ presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017

Agradecimentos

A Deus pela capacidade na realização do presente trabalho;

Ao meu orientador João Roberto Oliveira do Nascimento, por ter me orientado durante esta jornada com toda a sua paciência e por ter me confiado este trabalho, cuja importância em minha vida permanecerá imensurável;

A professora Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi Lysenko pela confiança e por todo conhecimento compartilhado;

Ao pesquisador Raimundo Mororó e a Fazenda Riachuelo que concederam a sementes fermentadas de cupuaçu;

Ao pesquisador Dr. Daniel Carvalho Pimenta do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã que colaborou na etapa de fracionamento e sequenciamento dos peptídeos, que com sua atenção e acessibilidade, contribuiu para a conclusão desse trabalho. Sou muito grata por todo conhecimento compartilhado;

Aos professores do laboratório de Bioquímica, Química e Biologia Molecular do departamento de alimentos e nutrição experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que forma atenciosa sempre compartilharam seu conhecimento, contribuindo assim para minha evolução na pesquisa: ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, Prof^a Dra. Neuza Hassimoto e ao Prof. Dr. João Paulo Fabi;

Aos técnicos: Lucia Justino Silva, Elias Araujo, Aline de Oliveira Santos. À MSc. Luciene Luer e a Dra. Tânia Shiga;

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (Nº 472070/2013-4);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo projeto Nº 2013/07914-8;

Aos amigos de laboratório que compartilharam comigo sua companhia e conhecimento: Victor, Samira, Eric, Gabriela, Thiago, Sabrina, Janayra e Virginia, ajudando assim a superar os desafios que surgiram ao longo dessa jornada;

À Dra. Juliana Nunes da Cruz, cuja contribuição para este trabalho foi imprescindível estando sempre disponível e compartilhando seu conhecimento de forma atenciosa;

À Dra. Patrícia Sinnecker que desde a minha graduação compartilhou com maestria seus conhecimentos sobre bromatologia, o que contribuiu para a minha escolha dessa área;

Aos funcionários do Departamento de Alimentos de Nutrição Experimental;

À minha mãe que sempre me apoiou de forma incondicional e especialmente durante a realização desse trabalho.

Muito obrigada a todos!

“É preciso sentir a necessidade da experiência, da observação, ou seja, a necessidade de sair de nós próprios para aceder à escola das coisas, se as queremos conhecer e compreender.”

Émile Durkheim

RESUMO

Oliveira, S. G. **Avaliação do potencial de formação de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I a partir de hidrolisados proteicos de amêndoas de cupuaçu fermentadas.** 2017. 93 p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Peptídeos com ação inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina I (ECA) e com o potencial de reduzir a pressão arterial têm sido obtidos a partir de diferentes tipos de alimentos ou matérias-primas, sendo grande o interesse em aproveitar resíduos da indústria alimentícia como fontes desses peptídeos. Neste aspecto, as amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.), que são em sua maioria descartadas pela indústria, apresentam um teor considerável de proteínas e poderiam ser aproveitadas como fontes de peptídeos inibidores da ECA. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se o concentrado proteico obtido a partir de amêndoas fermentadas de cupuaçu após ser submetido à hidrólise com a enzima pepsina poderia gerar peptídeos com ação inibitória sobre a ECA *in vitro*. Foi observado que após a hidrólise do concentrado proteico com pepsina por 1h foi obtido um efeito de 50 % de inibição da ECA, em ensaio realizado com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Posteriormente, esse hidrolisado foi submetido ao fracionamento por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) e resultou em cinco frações (F1-F5), das quais a terceira teve uma subfração (F3.1) com quatro novos peptídeos identificados por LC-MS/MS com potencial em inibir a ECA. Esses quatro peptídeos (FWVAM, YRLAF, LGYFK, VTTVVTGLTF) foram sintetizados e submetidos aos ensaios para a determinação do IC_{50} e K_i . Os peptídeos YRLAF e LGYFK, que apresentaram mecanismo de inibição do tipo competitivo e acompetitivo, respectivamente, tiveram valores de IC_{50} de 4.73 e 11.11 μ M, e de K_i de 9.14 e 8.15 μ M. Dentre os peptídeos identificados merece destaque VTTVVTGLTF que demonstrou ser um inibidor do tipo acompetitivo e apresentou as menores IC_{50} (0.70 μ M) e K_i (2.79 μ M). Em contraste, FWVAM atuou como substrato da ECA e não peptídeo inibidor. A partir dos resultados obtidos neste estudo fica demonstrado que as amêndoas fermentadas de cupuaçu podem ser fonte de peptídeos com ação inibitória da ECA, com potencial efeito anti-hipertensivo a ser, futuramente, investigado a partir de estudos *in vivo*.

Palavras – chave: peptídeos bioativos, amêndoas fermentadas de cupuaçu, atividade inibitória da ECA.

ABSTRACT

Oliveira, S. G. **Evaluation of the formation of angiotensin I - converting enzyme inhibitor peptides from protein hydrolysates of fermented cupuassu almonds.** 2017. 93p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides with the potential to reduce blood pressure have been obtained from different types of food or raw materials, and there is a great interest in utilize residues from the food industry as sources of peptides. In this regard, cupuassu almonds (*Theobroma grandiflorum* S.), which are mostly discarded by the industry, has a considerable protein content and could be used as source of ACE-inhibiting peptides. Thus, the objective of this work was to verify if the protein concentrate obtained from fermented almonds of cupuassu after being submitted to the hydrolysis with the enzyme pepsin could generate peptides with inhibitory activity on ACE *in vitro*. In this study it was observed that after hydrolysis of the protein concentrate with pepsin for 1 h, a 50% effect of ACE inhibition was obtained in an assay performed with the Abz-FRK (Dnp) -P-OH substrate. Posteriorly, the hydrolyzate was subjected to fractionation by reverse phase chromatography (RP-HPLC) and resulted in five fractions (F1-F5), of which the third had a subfraction (F3.1) with four new peptides identified by LC-MS / MS with the potential to inhibit ACE. These four peptides (FWVAM, YRLAF, LGYFK, VTTVVTGLTF) were synthesized and assayed for IC_{50} and K_i . The YRLAF and LGYFK peptides, which showed a competitive and uncompetitive type inhibition mechanism respectively, presented IC_{50} values of 4.73 and 11.11 μ M, and the values for K_i were 9.14 and 8.15 μ M. Among the peptides identified, it is possible to highlight VTTVVTGLTF, which was shown to be an inhibitor of the uncompetitive type and presented the lowest value for IC_{50} (0.70 μ M) and K_i (2.79 μ M). While FWVAM acted as a substrate of the ACE and not as an inhibitory peptide. From the results obtained in this study it is demonstrated that cupuassu fermented almonds can be a source of peptides with ACE inhibitory activity with potential antihypertensive effect to be further investigated from in vivo studies.

Keywords: bioactive peptides, cupuassu fermented almonds, ACE-inhibitory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das duas isoformas da ECA: O sítio ativo contendo zinco é representado por HEXXH (His-Glu-X-X-His) e a faixa preta representa o domínio das transmembranas.....	21
Figura 2 – Fruto de Cupuaçuzeiro.....	29
Figura 3 - Representação da semente/ amêndoa de cupuaçu.....	30
Figura 4 – Representação esquemática do processamento de sementes de cupuaçu para a obtenção do cupulate.....	31
Figura 5 - Amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas.....	36
Figura 6 – Grau de hidrólise do concentrado proteico para a amêndoa fermentada e seca submetida ao tratamento com pepsina expresso em porcentagem, no período de 6h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como <i>post hoc</i> ; $p < 0,05$).....	52
Figura 7 – Grau de hidrólise do concentrado proteico para a amêndoa fermentada e seca incubada em pH 2, no período de 6h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como <i>post hoc</i> ; $p < 0,05$).....	54
Figura 8 - Perfil eletroforético das proteínas em SDS-PAGE a 15% de acrilamida, revelado com Coomassie Brilliant Blue R-250. (1) padrão de massa molecular <i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i> (170 kDa); (2) proteínas da farinha seca e desengordurada da semente fresca de cupuaçu; (3) proteínas da farinha seca e desengordurada da amêndoa fermentada e seca de cupuaçu; (4) concentrado proteico da amêndoa fermentada de cupuaçu; (5) hidrosilado obtido por emprego da pepsina em 3h de ensaio; (6) hidrosilado obtido por emprego da pepsina em 6h de ensaio; (7) hidrosilado obtido após 3h de autólise em pH 2 e (8) hidrosilado obtido após 6h de autólise em pH 2.....	55
Figura 9 – Ensaio do Grau de inibição da ECA (expressa em %) para o concentrado proteico de amêndoa fermentada de cupuaçu hidrolisado com pepsina, referente a 0,1,2,3,4,5 e 6 horas de reação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão (n=3). Para o ensaio foi empregado o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH.....	57
Figura 10 - Ensaio do Grau de inibição da ECA (expressa em %) para o concentrado proteico de amêndoa fermentada de cupuaçu autolisado meio ácido, referente a 0,1,2,3,4,5 e 6 horas de reação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão (n=3). Para o ensaio foi empregado o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH.....	58
Figura 11 - Ensaio do Grau de inibição da ECA (expressa em %) para a pepsina em meio ácido, referente a 0,1,2,3,4,5 e 6 horas de reação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão (n=3). Para o ensaio foi empregado o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH.....	59
Figura 12 – Perfil cromatográfico do hidrolisado e do autolisado proteico separados RP-HPLC utilizando coluna C ₁₈ (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m). A eluição foi realizada com um gradiente de 10 a 100 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido acético com fluxo de 1 mL.min ⁻¹ . A detecção da absorbância foi realizada em 214 e 280 nm.....	61
Figura 13 – Perfil cromatográfico do hidrolisado proteico da amêndoa de cupuaçu separado por RP-HPLC, utilizando coluna C ₁₈ (ACE 5) (250 x 4.6 mm). A eluição da fração foi realizada com gradiente de 10 a 80 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido acético com fluxo de 1 mL.min ⁻¹ . A detecção da absorbância foi realizada em 214 e 280 nm. As frações foram coletadas a cada 5 min, perfazendo no total cinco frações (F1-F5).....	62

Figura 14 – Perfil de atividade inibitória da ECA (%) de cinco frações separadas (F1- F5). Para o ensaio foi empregado o método de fluorescência com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH), foram utilizados diferentes volumes de cada fração nos ensaios. Os valores correspondem a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....63

Figura 15 – Perfil cromatográfico do subfracionamento da F3 por RP- HPLC, utilizando coluna C₁₈ (ACE) (250 x 7,75mm). A eluição foi realizada com gradiente de 10 a 40 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido acético com um fluxo de 3 mL.min⁻¹. A detecção da absorbância foi realizada em 214 e 280 nm. As frações foram coletadas de 6.7 a 22 min, perfazendo um total de quatro subfrações.....64

Figura 16 - Perfil de atividade inibitória da ECA (%) de quatro subfrações coletadas de F3 (F3.1 – F3.4) por RP-HPLC. Para o ensaio foi empregado o método de fluorescência com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH), sendo utilizados diferentes volumes de cada sub fração nos ensaios. Os valores correspondem a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....65

Figura 17 – (A) Perfil cromatográfico da subfração F3.1 monitorada a 214 nm, (B) cromatograma de íons (TIC).....66

Figura 18 - Sequenciamento do peptídeo YRLAF obtidos a partir da subfração F3.1 (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica dos íons no tempo de retenção 15,4 min. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo* do peptídeo YRLAF.....67

Figura 19 - Sequenciamentos do peptídeo VTTVVTGLTF obtido a partir da subfração F3.1. (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica dos íons no tempo de retenção 19,71. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo* do peptídeo VTTVVTGLTF.....68

Figura 20 - Sequenciamentos do peptídeo FWVAM obtido a partir da subfração F3.1. (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica dos íons no tempo de retenção 19,8. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo* do peptídeo VTTVVTGLTF.....69

Figura 21 - Sequenciamento do peptídeo LGYKF obtido a partir da subfração F3.1. (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica do íon no tempo de retenção 20,3. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo*.....69

Figura 22 – Curvas semilogarítmicas da determinação da IC₅₀ relativa à atividade inibitória da ECA. Os valores foram obtidos a partir de diferentes concentrações (expressos em μ M) dos peptídeos sintéticos: YRLAF (A), VTTVVTGLTF (B), FWVAM (C), LGYKF (D).....75

Figura 23 : Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de cinética de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (-●-) e na presença de peptídeo inibidor YRLAF nas concentrações 0,8 μ M (-▲-), 1,61 μ M (-■-), 3,23 μ M (-■-) e 4,85 μ M (-●-).....77

Figura 24: Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de cinética de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (-●-) e na presença de peptídeo inibidor LGYKF nas concentrações 1,1 μ M (-■-), 2,2 μ M (-■-), 4,4 μ M (-▲-), 6,6 μ M (-▲-), 8,7 μ M (-●-).....78

Figura 25: Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de cinética de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (-●-) e na presença de peptídeo inibidor VTTVVTGLTF nas concentrações 0,61 μ M (-▲-), 1,23 μ M (-▲-), 2,46 μ M (-■-), 3,7 μ M (-■-) e 5 μ M (-●-).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alimentos funcionais ou ingredientes já comercializados contendo peptídeos com ação hipotensiva.....	24
Tabela 2 - Composição Centesimal das amêndoas fermentadas e secas e fermentadas/ torradas de cupuaçu (g/100g de proteína em base úmida).....	51
Tabela 3 – Composição aminoacídica das amêndoas fermentadas e fermentadas/ torradas. Resultados em g/100g de amostra.....	70
Tabela 4 – Peptídeos identificados da subfração 3.1, obtida a partir do hidrolisado da amêndoa de cupuaçu fermentada e sequências peptídicas já identificadas como inibidoras da ECA disponíveis no banco de dados BIOEP.....	72
Tabela 5 - Análise <i>in silico</i> da ação de enzimas gastrointestinais sobre os peptídeos sintetizados, a partir da ferramenta “ação da enzima” disponível no BIOPEP.....	73
Tabela 6 - Valores de IC_{50} e de constante de inibição (K_i) dos peptídeos sintéticos.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUF.min-1	Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido.
ECA	Enzima conversora de angiotensina.
FRET	Transferência de ressonância de energia por fluorescência
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HHL	Hipuril – Histidil-Leucina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir em 50% a atividade da ECA
KDa	Kilo Daltons
K _i	Constante de inibição
LC/ MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas
MS	Espectrometria de massas
PA	Pressão arterial
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
U	Unidades de enzima
UAF.min ⁻¹	Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto
UV	Ultravioleta

LISTA DE ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS

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

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 PEPTÍDEOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS	17
1.2 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	18
1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	19
1.4 INIBIÇÃO DA ECA EM MODELOS EXPERIMENTAIS	22
1.5 APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS	23
1.6. A INFLUÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS NA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS	25
1.7 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA COMO POTENCIAL FONTE DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS	26
1.8 O CUPUAÇU	28
1.9 PROCESSAMENTO INDUSTRIAL	30
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 MATERIAL	36
3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	36
3.2.1 Determinação do teor de lipídeos	37
3.2.2 Determinação do teor de proteínas	37
3.2.3 Determinação do teor de umidade	37
3.2.4 Determinação do teor de cinzas	37
3.2.5 Determinação do teor de fibras totais	37
3.3 PREPARO DA AMOSTRA	37
3.3.1 Obtenção do concentrado proteico	38
3.3.2 Determinação dos aminoácidos totais	39
3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	39
3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLICRIAMIDA (SDS-PAGE)	40
3.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE	41
3.8 FRACIONAMENTO DOS PEPTÍDEO POR RP-HPLC	43

3.9 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAMENTO <i>DE NOVO</i>	44
3.10 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	45
3.11 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ E CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K_i)	45
3.12 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS	47
3.13 ANÁLISE DOS DADOS	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	48
4.2 TEOR DE PROTEÍNAS DO CONCENTRADO PROTEICO	49
4.3 AMINOÁCIDOS TOTAIS	50
4.4 GRAU DE HIDRÓLISE	52
4.5 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE E DA AMÊNDOA DE CUPUAÇU E DOS HIDROLISADOS E AUTOLISADOS PROTEICOS	54
4.6 GRAU DE INIBIÇÃO DA ECA	56
4.7 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA	60
4.8 SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA	65
4.9 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ E DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K_i)	74
4.10 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS	77
5. CONCLUSÕES	80
REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

Além do aporte nutricional, o consumo de alguns alimentos está associado a vários efeitos biológicos benéficos à saúde, devido à ação de compostos bioativos. Neste sentido, peptídeos que podem apresentar diferentes ações biológicas têm sido identificados nas últimas décadas. Dentre os efeitos relacionados aos peptídeos bioativos, o que possui o mecanismo de ação melhor compreendido é o de ação anti-hipertensiva, sendo um dos efeitos dos peptídeos bioativos mais extensivamente estudados. Estes peptídeos atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona, um dos principais mecanismos de controle da pressão arterial (RUTHERFURD- MARKWICK e MOUGHAN, 2005; ROY et al. 2010).

Dentre os alimentos com peptídeos com ação anti-hipertensiva o leite é um dos que têm tido mais destaque neste aspecto (FITZGERALD e MEISEL, 2000; RYAN et al. 2011). No entanto, várias leguminosas e sementes também apresentaram esse potencial, como é o caso da soja, lentilhas, feijões e cacau (LO e LI-CHAN, 2005; BOYE et al 2010; UCO et al. 2009; RUI et al. 2011; SARMADI et al. 2011).

Para que tenham efeito é essencial que esses peptídeos primeiro sejam liberados das sequências proteicas dos alimentos, processo que geralmente é resultado da hidrólise enzimática *in vivo*, *in vitro* ou de processamento (GUANG e PHILLIPS, 2009).

Embora os estudos com tais peptídeos não tenham como objetivo substituir os tratamentos medicamentosos, os benefícios de seu consumo merecem atenção, por não apresentarem reações adversas e pelo seu potencial em poder atuar junto ao tratamento convencional.

1.1 PEPTÍDEOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS

Proteínas de origem vegetal ou animal podem conter peptídeos que após serem clivados da cadeia proteica apresentam atividade biológica. A hidrólise dos peptídeos pode ocorrer *in vivo* pela ação das enzimas digestivas ou *in vitro* através da ação de enzimas específicas. Além da hidrólise enzimática, podem ser obtidos também por fermentação, no entanto, o uso de enzimas é o mais empregado, devido a seu menor custo, rapidez e especificidade (ALEIXANDRE e MIGUEL, 2011).

A primeira referência à atividade biológica dos peptídeos foi feita por MELLANDER em 1950, em um estudo no qual se constatou que peptídeos fosforilados derivados de caseína aumentaram a calcificação óssea de crianças raquíticas, independente da vitamina D. Nas décadas seguintes peptídeos bioativos passaram a ser extensivamente estudados, especialmente a partir da década de 80, e tais estudos persistem até os dias atuais, fato que permitiu que vários tipos de ações biológicas dos peptídeos fossem identificadas, a partir de diferentes fontes proteicas (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001).

Dentre as atividades dos peptídeos podem ser destacados os efeitos: anti-hipertensivo, hipoglicemiante, antioxidante, antitrombótico, antimicrobiano e anti-inflamatório. Dentre todas as ações biológicas dos peptídeos bioativos o mecanismo de ação do efeito anti-hipertensivo é o melhor compreendido uma vez que peptídeos com potencial de reduzir a pressão arterial são o tipo identificado com mais frequência em alimentos (RUTHERFURD- MARKWICK e MOUGHAN, 2005; ROY et al. 2010, DURAK et al. 2013). Tais peptídeos atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona, inibindo a ECA, de modo competitivo, uma vez que se ligam ao sítio ativo da enzima, impedindo-a de hidrolisar a angiotensina I (VERMEIRSSSEN et al. 2002).

Peptídeos inibidores da ECA normalmente possuem sequências de 2 a 12 aminoácidos, pois o sítio ativo da ECA parece acomodar apenas sequências curtas. Outras características também relacionadas a estes peptídeos são: hidrofobicidade, cadeias aromáticas na posição C - terminal ou possuem cadeias alifáticas ramificadas cuja posição N - terminal compreende os aminoácidos valina ou isoleucina e/ ou é positivamente carregada com aminoácidos arginina ou lisina na posição C – terminal. (LO e LI-CHAN, 2005; CHEUNG et al. 2009).

Foi observado também que, à semelhança do que ocorre com inibidores sintéticos da ECA, peptídeos contendo o aminoácido prolina na última ou penúltima posição do grupo C - terminal são associados a um maior potencial de inibição (CHEUNG e CUSHMAN 1972). Isto foi constatado também em alguns estudos *in vivo*, com ratos espontaneamente hipertensos, sendo concluído que especialmente as sequências di- e tri-peptídicas com prolina ou triptofano como aminoácido C - terminal reduziram a PA. Adicionalmente, é descrito que quando há a sequência Pro-Pro na região C-terminal há resistência do aminoácido às proteases digestivas e as peptidases específicas de prolina. Sequências contendo lisina, arginina, fenilalanina, tirosina na posição C-terminal podem contribuir para uma potente inibição da ECA. Quanto ao tamanho das sequências, é reportado que sequências com 2 ou 3 peptídeos são mais facilmente absorvidas no intestino (RUTHERFURD- MARKWICK e MOUGHAN, 2005; MEGÍAS et al 2004; ROY et al. 2010; CHEUNG et al. 2009).

1.2 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Como já mencionado, a hidrólise enzimática é a principal forma de obtenção de peptídeos bioativos e algumas enzimas comerciais têm se demonstrado mais específicas em clivar sequências com potencial de inibir a ECA, como é o caso da alcalase, collagenase, papaína, tripsina, pepsina, dentre outras (POWNALL, et al. 2010; GUILLÉN et al. 2011).

Enzimas gastrointestinais como a pepsina, não só têm se mostrado eficientes em gerar peptídeos bioativos a partir de diferentes proteínas com potencial em inibir a ECA, como também são capazes de dar origem a peptídeos menores do que os obtidos com enzimas comerciais e com um IC₅₀ bem menor (MOHANTY et al. 2016; ALEIXANDRE e MIGUEL, 2011). Porém, cada tipo de material, ou seja, cada fonte proteica pode exigir um tipo de enzima ou combinação de enzimas. No entanto, em alguns casos foi reportado que o uso seguido de enzimas clivou peptídeos obtidos em etapas anteriores, eliminando assim seu efeito inibitório sobre a ECA (GUANG e PHILLIPS, 2009).

A enzima pepsina têm se mostrado eficiente em hidrolisar matrizes proteicas e gerar peptídeos como potencial em inibir a ECA, como observado com ovo

(ZAMBROWICZ et al. 2013), salmão (DAREWICZ et al. 2014) e leite (LEE et al. 2005). Também em batatas, Kuramoto et al. (2013) utilizou essa enzima como forma de obter peptídeos bioativos, sendo identificados dois peptídeos inibidores da ECA, dos quais um com forte ação anti-hipertensiva quando administrado por via oral em ratos espontaneamente hipertensos.

Quanto à sua especificidade, a pepsina cliva de forma preferencial ligações peptídicas adjacentes aos grupos amino e carboxílicos terminais de aminoácidos aromáticos e grupos carboxílicos dos aminoácidos leucina, ácido aspártico e glutamina (NEVES, 2005).

Como a ação biológica melhor compreendida desses peptídeos obtidos a partir da hidrólise enzimática é seu potencial anti-hipertensivo, com atuação no sistema renina-angiotensina-aldosterona, esse mecanismo que compreende um dos principais mecanismos de controle da pressão arterial será descrito a seguir.

1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida como a elevação persistente da pressão diastólica ou sistólica em relação ao valor considerado padrão. A pressão diastólica é a força exercida pelo coração para bombear o sangue, já o relaxamento entre as contrações corresponde à pressão sistólica. O aumento da pressão arterial pode ocorrer devido o aumento do débito cardíaco e, entre os fatores que podem alterar a quantidade de sangue bombeado estão o aumento da frequência cardíaca e o funcionamento anormal dos rins. O aumento da resistência vascular periférica também pode elevar a pressão arterial (PA). Como ocorre quando as artérias perdem a elasticidade, apresentando rigidez e assim exercendo resistência ao sangue bombeado (CARNEVALE, 2006).

Valores de pressão arterial acima de 140 mm Hg para a pressão sistólica e 90 mm Hg para pressão diastólica caracterizam a doença (CHOBANIAN et al. 2003) e a maioria dos pacientes hipertensos possui hipertensão primária, que é definida quando não há uma causa específica para o desenvolvimento desta (ALEIXANDRE e MIGUEL, 2011). Os principais sintomas da HAS são dor de cabeça, visão turva, vômitos e

perturbação da consciência, porém, em muitos casos é assintomática, razão pela qual muitos pacientes a portam por muitos anos sem ter conhecimento. Quando não tratada a HAS pode levar a acidente vascular encefálico, edema agudo de pulmão, infarto e insuficiência renal (NOBRE et al. 2002). Assim, o cuidado com a pressão arterial é importante, pois a (HAS) constitui o maior fator de risco para doenças cardiovasculares, sendo esta a principal causa de mortes no Brasil, estando associada a 20% de todas as mortes em pessoas acima de 30 anos (MANSUR e FAVARATO, 2012).

Há diferentes mecanismos de controle da pressão arterial. As respostas nervosas, por exemplo, são de ação rápida e envolvem diferentes mecanismos, tais como: *feedback* dos barorreceptores; reflexo quimioceptor e resposta isquêmica do sistema nervoso central. Dentre os mecanismos que controlam a PA dentro de um tempo determinado estão: o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o equilíbrio hidroeletrólítico. Já o mecanismo de regulação da PA a longo prazo é feito pela excreção de sódio e água pelos rins (GUYTON e HALL, 1997). Dentre esses, o sistema renina-angiotensina-aldosterona é um dos principais mecanismos de regulação homeostática da pressão arterial (NEVES, 2005). Neste sistema, quando receptores nos rins detectam a redução da pressão ou do nível de sódio no sangue, há a síntese de renina, uma aspartilprotease ácida, pelas células justaglomerulares nos rins. A renina então liga-se ao seu único substrato, o angiotensinogênio, sintetizado no fígado, e transforma-se então na angiotensina I, um decapeptídeo que não possui nenhuma ação biológica. No entanto, quando a ECA cliva o dipeptídeo carboxi terminal (His-Leu), há a conversão para a angiotensina II, um potente vasoconstrictor, que também estimula a síntese de aldosterona, cuja função é aumentar a retenção de água nos rins. Adicionalmente, a ECA degrada a bradicina, um peptídeo com ação vasodilatadora, através da remoção sequencial de dois dipeptídeos C-terminais da bradicinina.

A ECA é uma metalopeptidase que possui zinco, é sintetizada no pulmão e é dependente de íon cloreto para ser ativada. Possui duas isoformas, a somática e a germinativa. A somática está presente em células endoteliais e epiteliais, enquanto a germinativa encontra-se apenas nas células dos testículos. Ambas as isoformas possuem um domínio C-terminal hidrofílico, um ectodomínio N-terminal e um domínio

transmembrana hidrofóbico que ancora a proteína. Enquanto a forma somática possui dois sítios ativos, a somática possui apenas um (**Figura 1**) (RIORDAN, 2003; GUANG e PHILLIPS, 2009).

Figura 1 - Representação das duas isoformas da ECA: O sítio ativo contendo zinco é representado por HEXXH (His-Glu-X-X-His) e a faixa preta representa o domínio das transmembranas. Fonte: RIORDAN (2003).

Guang e Phillips (2009) reportaram que enquanto a atividade da região C-terminal da forma somática está diretamente relacionada à presença do íon cloreto, a região N-terminal pode apresentar atividade mesmo em baixas concentrações ou na ausência desse íon. Outra diferença de atividade apontada para os domínios da forma somática foi quanto à especificidade, pois enquanto ambos os domínios hidrolisam a bracinina de forma semelhante, o sítio ativo do domínio C pode hidrolisar preferencialmente a angiotensina I, o substrato P e hipuril-histidil-leucina (HHL). Já o domínio N hidrolisa de forma específica a angiotensina (1-7), do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LH-RH) e do peptídeo hematoregulatório N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) (NEVES, 2005).

Os inibidores da ECA foram descobertos a partir de fatores presentes no veneno de serpentes da espécie *Bothrops jararaca* em 1965, sendo que o isolamento de tal inibidor levou posteriormente à síntese do captopril (FERREIRA, 1965). Este medicamento deu início a uma classe de medicamento, os inibidores da ECA, que são muito importantes do tratamento da HAS. Seu mecanismo de ação consiste na interação do medicamento com o sítio ativo contendo Zn, a mesma região que interage com a Angiotensina I (QUIST et al. 2009; ALEIXANDRE e MIGUEL, 2011). No entanto, apesar de sua potente ação os inibidores de ECA podem apresentar vários efeitos adversos, especialmente tosse seca persistente, já relatada em 44% dos pacientes e em menor proporção reações alérgicas na pele (SBH/ SBC / SBN, 2002). Devido à alta

incidência de efeitos adversos pelo uso do captopril foram desenvolvidos outros medicamentos também inibidores da ECA, como a maleato de enalapril, uma pró-droga que não contém tiol, visto que os efeitos adversos do captopril foram associados à presença do grupo sulfidril em sua molécula (SKELLERN,1989). Sendo assim, devido aos efeitos adversos do tratamento, bem como o alto custo que este pode apresentar, e o impacto que a doença pode ter na vida das pacientes, existe na busca por formas alternativas de controlar a PA.

1.4 INIBIÇÃO DA ECA EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Em relação a ensaios *in vitro* de inibição da ECA têm sido empregados diferentes substratos, pois sabe-se que a ECA hidrolisa vários peptídeos, tais como: hipuril-histidil-leucina (HHL), substância P, N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), hormônio liberador do hormônio luteinizante (LH-RH), neurotensina e os substratos Abz-SDK (Dnp) P-OH, Abz-LKF (Dnp) OH e Abz-FRK (Dnp) P-OH, sendo que neste último substrato mencionado, Abz corresponde o ácido ortho-aminobenzoico; e Dnp corresponde a 2,4- dinitrofenil (CARMONA et al. 2006, NEVES, 2005).

O uso do substrato HHL tem sido muito aplicado em ensaios que avaliam a atividade catalítica. Como já descrito anteriormente, após a conversão para Angiotensina II, são clivados os resíduos histidil - leucina (HL) da Angiotensina I, assim após a hidrólise do substrato HHL pela ECA são obtidos dois produtos: o ácido hipúrico e histidil-leucina. Assim, para determinar o grau de inibição da ECA é feita a quantificação do ácido hipúrico formado a partir dessa reação.

Dentre os métodos descritos anteriormente para a determinação da inibição da ECA, pode-se destacar o método desenvolvido por Carmona et al. (2006) baseado na transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), neste método o substrato como anteriormente comentado, compreende o ácido aminobenzóico (Abz), como grupo fluorescente e o 2, 4 dinitrofenil (Dnp), como grupo receptor. Ambos os grupos estão em um estado de excitação, porém quando o peptídeo que liga os grupos doador/ receptor é hidrolisado pela ECA o grupo aminobenzóico passa a emitir

fluorescência de forma contínua o que permite medir assim a atividade da ECA. Os três substratos utilizados nesse método diferem-se com relação à sua especificidade, o substrato Abz-SDK(Dnp)P-OH pode ser hidrolisado pelo domínio N da ECA, já o substrato Abz-LFK(Dnp)-OH pode ser hidrolisado pelo domínio C da ECA, e o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH que pode ser hidrolisado por ambos os domínios da forma somática da ECA.

Alves et al. (2005) e Cruz (2015) avaliaram a inibição da ECA utilizando o substrato HHL e também a metodologia por FRET, ambos concluíram que o método fluorimétrico mostra-se tão sensível quanto o método com HHL, além de ser mais rápido.

1.5 APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

O uso e comercialização de produtos enriquecidos com peptídeos bioativos têm sido explorados especialmente na Europa e na Ásia, onde podem ser encontrados não só em formulações, mas também em cápsulas. Na Europa, por exemplo, há a comercialização de cápsulas com peptídeos bioativos obtidos a partir do leite com efeito calmante, em um produto que foi baseado em trabalhos realizados com humanos que mostraram o potencial calmante e regulador do sono de tais peptídeos sem, no entanto, apresentar efeitos colaterais (SAINT-HILAIRE et al. 2009; MESSAOUDI et al. 2008).

Nesses continentes também podem ser encontrados produtos como refrigerantes, leites enriquecidos com peptídeos inibidores de ECA ou até mesmo iogurte que em sua fórmula contém peptídeos com ação imunomoduladora (CHOI et al. 2012; ABDOL et al. 2013).

Na **Tabela 1** estão listados alguns exemplos de alimentos funcionais e ingredientes já comercializados que contém peptídeos com ação hipotensiva.

Tabela 1 - Alimentos funcionais ou ingredientes já comercializados contendo peptídeos com ação hipotensiva.

Nome do Produto	Fabricante	Tipo de Alimento	Peptídeos Bioativos
Calpis AMEEL S (Japão) ou Calpico (Europa)	Calpis Co., Japão	Leite fermentado	VPP, IPP
Evolus	Valio, Finlândia	Leite fermentado	VPP, IPP
BioZate	Davisco, EUA	β -LG hidrolisado	Peptídeos do soro do leite
C12 Peption	DMV, Holanda	Ingrediente	FFVAPFPEVFGK
Peptide Soup	NIPPON, Japão	Sopa	Peptídeos derivados do peixe bonito
Casein DP Peptio Drink	Kanebo, Japão	Refrigerante	FFVAPFPEVFGK

Fonte: HARTMANN e MEISEL, 2007.

Como apresentado na **Tabela 1**, produtos já comercializados que contém peptídeos com ação hipotensiva podem ser encontrados em diferentes tipos de formulações, tais como leite fermentado, sopa ou refrigerante. Os produtos Calpis AMEEL S e Evolus são comercializados como leite fermentado, para ambos é apontado que as sequências tri-peptídicas VPP e IPP estão relacionadas à sua ação hipotensiva. E como anteriormente mencionado, é apontado que quando há a sequência prolina-prolina, na região C – terminal do peptídeo há a resistência das enzimas gastrointestinais. O produto BioZate é um hidrolisado proteico que contém peptídeos bioativos obtidos a partir do soro do leite. Já os produtos C12 Peption e Casein DP Peptio Drink, comercializados como ingrediente e refrigerante contém o dodecapeptídeo FFVAPFPEVFGK, este peptídeo contém o aminoácido fenilalanina entre os 3 últimos resíduos da parte C – terminal do peptídeo, característica essa que como anteriormente mencionado está relacionada a uma potente inibição da ECA. Já o produto Peptide Soup, comercializado como sopa, contém peptídeos bioativos derivados do peixe bonito.

A existência de tais produtos demonstra o potencial do emprego dos peptídeos bioativos no enriquecimento de formulações alimentícias, ou até mesmo a administração destes na forma de suplementação.

1.6. A INFLUÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS NA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os pré-tratamentos ou processamento aos quais algumas matérias-primas são submetidas durante a sua industrialização podem mudar o seu perfil proteico. A fermentação, um processo ao qual vários alimentos e bebidas são submetidos, é um exemplo, pois, pode ocorrer a hidrólise das proteínas, como resultado das transformações bioquímicas que ocorrem durante este processo. A desnaturação das proteínas, como resultado do emprego de tratamento térmico é outro exemplo, pois há a desnaturação estrutural da proteína, além do que há a inativação de fatores anti-nutricionais, como as lectinas (ROGERS e GIBON, 2009; KELKAR et al. 2012). Tais efeitos normalmente são desejados, pois a alteração no perfil proteico e o aumento de aminoácidos livres estão geralmente envolvidos com a obtenção das características no produto final, tal como aroma, sabor e textura. Além disso, tais tratamentos têm sido estudados também quanto a sua influência na obtenção de peptídeos bioativos, de forma isolada ou juntamente com emprego de tratamento enzimático.

De qualquer maneira, diversos estudos procuram avaliar o efeito do cozimento e pré-cozimento na obtenção de peptídeos bioativos. Mojica et al. (2015), por exemplo, avaliou o efeito do pré-cozimento em quatro diferentes variedades de feijão, quanto a inibição da ECA e seu potencial efeito hipoglicemiante, pela inibição da dipeptidil peptidase IV (DDP IV). Foram comparados hidrolisados proteicos obtidos a partir de amostras cruas e pré-cozidas, ambas hidrolisadas com pepsina seguida de pancreatina. Para o grau de hidrólise, as amostras pré-cozidas apresentaram maiores valores, chegando a até 60% de hidrólise, enquanto que as amostras cruas não apresentaram valores maiores que 40%. A partir dos hidrolisados das amostras cruas foram identificados 11 peptídeos com atividade biológica, já para hidrolisados das amostras pré-cozidas foram identificados 17. Além do que, o IC_{50} do DDP-IV para

diferentes hidrolisados de amostras de feijão pré-cozido foi menor se comparado a amostras cruas. Em relação à fermentação, Sarmadi et al. (2011) simulou *in vitro* a autólise que ocorre no cacau, durante seu processo de fermentação. Tal processo foi realizado com duas variedades de cacau, ambas incubadas em duas diferentes condições de pH: 3,5 e 5,2. O ensaio de inibição da ECA feito com diferentes concentrações de material autolisado, permitiu concluir que as amostras autolisadas em pH 3,5 apresentaram uma atividade inibitória maior para ECA.

Assim, tratamentos que clivem as proteínas, podem originar peptídeos com atividade biológica. Além do que, os processamentos aos quais alguns alimentos são submetidos na indústria alimentícia também podem inativar fatores antinutricionais que ocorrem naturalmente em determinados alimentos, como por exemplo, nas sementes. A função de tais fatores nas sementes é a defesa contra patógenos ou insetos, é o caso dos inibidores de proteases, que por sua vez por serem termolábeis podem ser inativados durante o processamento industrial (CHEVREUIL et al. 2009, BENEVIDES et al. 2011). Desta forma, com a inativação dos inibidores de proteases, as enzimas proteolíticas empregadas em ensaios *in vitro* ou que atuam durante a digestão endógena podem ter seu efeito potencializado, com a consequente obtenção de um maior número de peptídeos bioativos. Assim, por relaxar a estrutura terciária da proteína, podem torná-las acessíveis às enzimas, o que pode favorecer a hidrólise enzimática e, consequentemente, a obtenção de peptídeos com atividade biológica (STANCIUC et al. 2010) .

1.7 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA COMO POTENCIAL FONTE DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Resíduos da indústria alimentícia têm sido estudados quanto ao seu potencial em fornecer peptídeos bioativos. Yongsawatdigul e Lapsongphon (2013) por exemplo, avaliaram a obtenção de peptídeos bioativos com potencial antioxidante a partir do resíduo da industrialização de um tipo de feijão. Após a extração de carboidratos desse feijão para a produção de macarrão, o material residual contendo entre 70 a 80 % de

proteínas normalmente é usado na alimentação animal ou descartado. No entanto, nesse trabalho tal resíduo foi submetido a diferentes tratamentos enzimáticos e os peptídeos obtidos apresentaram potencial ação antioxidante.

Subprodutos da produção pecuária também podem ser aproveitados como fonte de peptídeos bioativos, é o que demonstrou Zhang et al. (2013). Nesse trabalho o colágeno bovino foi submetido à alta pressão e tratamento térmico e, na sequência foi submetido a diferentes tratamentos enzimáticos. Como resultado, a partir desses pré-tratamentos foi possível obter valores máximos de 80 % de inibição da ECA. O material usado neste trabalho, o colágeno, é um percussor da gelatina, no entanto, muitas vezes é descartado ou usado em rações.

O gérmen do trigo é um subproduto da obtenção da farinha de trigo, que muitas vezes é descartado ou utilizado na alimentação animal (EMBRAPA, 2017). No entanto, Qu et al. (2012) utilizaram esse material, que possui cerca de 30% de proteínas, como fonte de peptídeos inibidores da ECA. Nesse trabalho o gérmen de trigo foi hidrolisado com diferentes concentrações de alcalase, em associação com ultrassom, a fim de otimizar a atividade proteolítica da enzima e consequente a inibição da ECA. Com essas combinações foram obtidos valores máximos de cerca de 60% de inibição *in vitro*.

Assim, os trabalhos destacados anteriormente são ilustrativos do potencial de diversos subprodutos da indústria alimentícia, com considerável teor proteico e que normalmente são descartados, utilizados na alimentação animal ou como adubos, poderiam ser utilizados como fonte de peptídeos biologicamente ativos, em especial com potencial de inibir a ECA.

Dentre resíduos da indústria alimentícia que poderiam ser aproveitados como fonte de peptídeos bioativos aqui no Brasil pode-se destacar a semente de cupuaçu que, apesar de possuir um potencial de industrialização semelhante às sementes de cacau é geralmente descartado. Seu potencial de industrialização, a descrição do processamento industrial e outras informações sobre o cupuaçu são descritas a seguir.

1.8 O CUPUAÇU

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é um fruto típico da região amazônica, encontrado principalmente no estado do Pará. Apontado como o fruto de maior potencial de exploração e industrialização da região, é apreciado nacionalmente e vêm ganhando também espaço no mercado internacional por sua polpa, da qual podem ser obtidos produtos como: sucos; refrescos; sorvetes; geleias e bombons (COHEN et al. 2004; GONDIM et. al. 2001, MATTIETO, 2011). Pertencente à mesma família do cacau (*Theobroma cacao*), a partir de suas sementes é possível obter produtos semelhantes aos obtidos das sementes de cacau, como a manteiga, o licor e o chocolate. No entanto, apesar da crescente exploração deste fruto, a maior parte das sementes de cupuaçu extraídas do fruto durante o beneficiamento da polpa são descartadas ou utilizadas como adubo. Além do seu potencial de industrialização, o cupuaçu tem demonstrado possuir um valor biológico superior ao cacau, especialmente com relação aos aminoácidos essenciais leucina, isoleucina e tirosina, os quais são limitantes no cacau (CARVALHO et al.2008; LOPES, 2000).

O fruto do cupuaçuazeiro é o maior do gênero *Theobroma*. Em forma de baga capsolóide pesa em média 1,5 kg, podendo chegar a 4kg (**Figura 2**). Cada fruto possui em média 36 sementes, no entanto, pode chegar a ter até 52 sementes, que correspondem de 20 a 30% do peso do fruto. As sementes se dispõem em cinco fileiras dentro do fruto e são envolvidas pela polpa, de cor branco-amarelada (Garcia, 2006 ; GONDIM et. al. 2001).

Figura 2 – Fruto de Cupuaçuzeiro.

Fonte: <http://www.idam.gov.br/producao-de-cupuacu-no-amazonas/#.VllfzdKrTIU>.

Quanto às variedades do cupuaçu, as mais exploradas comercialmente correspondem ao cupuaçu-redondo, cupuaçu-mamorana e cupuaçu-mamau (GONDIM et. al. 2001) .

A frutificação do cupuaçuzeiro ocorre entre novembro e junho, e a maturação pode ocorrer entre quatro meses e meio a cinco meses e meio depois. Colhem-se os frutos maduros que caem no chão, que podem ficar 3 ou 4 dias no campo, a fim de que a polpa que envolve as sementes libere os açúcares, essenciais no processo da fermentação (MATTIETO, 2001 *apud* ARAGÃO, 1992). A cada frutificação podem ser colhidas até 40 unidades por planta (MÜLLER et al. 1995) e, quando cultivado, normalmente o cupuaçuzeiro pode chegar a 8 metros. Porém, já foram encontradas em florestas, árvores com 18 metros (FIGUERÊDO et al., 1999).

Na **Figura 3** está representada a estrutura da semente de cupuaçu.

Figura 3 - Representação da semente/ amêndoa de cupuaçu (Garcia, 2006).

Após a colheita, os frutos podem ser encaminhados para o consumo *in natura*, ou seja, vão para mercados e feiras livres, especialmente nas regiões próximas de onde são colhidos. Outro destino para os frutos é a indústria, onde ocorre o beneficiamento, que corresponde à extração da polpa, processo que pode ser realizado de forma manual ou mecânica. A polpa congelada é consumida em todo o país e, somente uma pequena parcela de toda a produção de polpa é exportada (SOUZA et al. 2011).

Os principais estados produtores são: Pará, Amazonas, Rondônia e Acre. Grande parte de sua produção é semi-extrativista, porém, plantações, inclusive em outros estados além dos mencionados, têm sido realizadas, (FIGUERÊDO et al., 1999; CAVALCANTE, 1991). Quanto à sua produção, no estado do Pará foram produzidos cerca de 74 mil toneladas do fruto em 2012 (SEDAP, 2015). Enquanto o estado do Amazonas produziu cerca de 9 milhões de frutos em 2013 (IDAM, 2015).

1.9 PROCESSAMENTO INDUSTRIAL

Assim como acontece com o cacau, as sementes frescas de cupuaçu não apresentam as características de cor e sabor do produto final, no caso o cupulate. Assim, a fim de se obter o produto análogo ao chocolate as sementes do cupuaçu têm

de passar por dois processos determinantes para o desenvolvimento dos precursores de sabor e aroma: a fermentação e a torração. (Carvalho et al. 2008). Na **Figura 4** é representado de forma esquemática o processo industrial para a obtenção do cupulate.

São poucos os trabalhos sobre as transformações da semente que ocorrem durante a fermentação e torração do cupuaçu, se comparados aos que existem sobre o cacau, porém, foi demonstrado que as mudanças na microestrutura e alterações físico-químicas são bastante semelhantes (CUNHA et al. 1997). Por este motivo, muitas publicações ao descreverem tais transformações durante tais processos, adotam como referências o cacau.

Figura 4 – Representação esquemática do processamento de sementes de cupuaçu para a obtenção do cupulate (Nazaré et al. 1990)

1.9.1 Fermentação

A fermentação das sementes de cupuaçu ocorre por aproximadamente sete dias, não podendo ultrapassar este período, pois há o risco de degradação proteica, o que pode resultar em um produto com aroma e sabor desagradáveis, devido à produção de amônia. Da mesma forma, o período entre a quebra dos frutos e o início da fermentação não pode exceder mais de 24 horas. Normalmente a fermentação é realizada em caixas de madeira e as sementes são cobertas com folhas de bananeira ou saco de juta, a fim de evitar a perda de calor e o ressecamento excessivo (CEPLAC, 1980). A fermentação é um processo exotérmico em que a temperatura durante o processo pode chegar entre 35° a 40°C, sendo necessário o revolvimento das sementes a partir do segundo dia até o final do processo, a fim de que a temperatura não ultrapasse 45°C e ocorra à inativação das enzimas produzidas. Durante esta etapa há a perda da capacidade germinativa da semente, que passa a ser denominada amêndoa e iniciam-se as reações bioquímicas complexas promovidas por microrganismos, cujos metabólitos e transformações são responsáveis pelos precursores do sabor e aroma característico do cupulate (GARCIA, 2006; SCHWAN, 1998).

Nas sementes já despulpadas a fermentação inicia-se por ação das leveduras presentes na casca da semente, porém, microrganismos provenientes do contato com as mãos dos trabalhadores e do recipiente onde já foram realizadas outras fermentações podem contribuir para o processo (MATTIETO, 2011). A fermentação alcoólica ocorre a partir do açúcar residual da polpa mucilaginosa (casca) presente em volta da semente. Primeiramente há a fermentação aeróbia pela ação das leveduras, seguida da etapa posterior compreendendo a fermentação anaeróbia, com a ação de bactérias do tipo lácticas e acéticas. Pela metabolização do ácido cítrico, as leveduras provocam o aumento do pH, mudança esta que favorece o crescimento das bactérias. Adicionalmente, as leveduras estão relacionadas à produção de etanol e de ácidos orgânicos, tais como o ácido acético e o ácido láctico, além da síntese de alguns compostos voláteis, precursores do aroma característico (LOPES et al. 2003; SCHWAN, 1998). O aumento da temperatura da massa é devido à intensa atividade

dessa segunda fase da fermentação e pela a ação do calor e a presença dos ácidos orgânicos já citados ocorre a perda da capacidade germinativa da planta. Sendo que devido à quebra celular há produção de exsudado (GARCIA, 2006; LOPES et al. 2003; MATTIETTO, 2011; CARVALHO et al. 2008). O fim do processo de fermentação pode ser caracterizado pela perda total da mucilagem, mudança de cor para castanho, redução do sabor amargo e o resfriamento das amêndoas (RIBEIRO et al. 2005)

Durante a fermentação há a atuação das seguintes enzimas: amilase; celulase; invertase; lipase; pectinesterases; poligalacturonases; peroxidases; polifenoloxidasas e proteases. Estas enzimas encontram-se presentes na própria semente, provenientes da polpa do fruto, ou contidas nas leveduras presentes no processo de fermentação. Nesse conjunto de enzimas, podem-se destacar as proteases, especialmente a endoprotease aspártica e a carboxipeptidase, que clivam parte das proteínas em peptídeos e aminoácidos livres, produtos esses apontados como responsáveis pelo sabor característico do produto final, o cupulate (GARCIA, 2006; BRITO, et al. 2004).

A redução do amargor e adstringência após a fermentação é atribuída a complexação dos aminoácidos hidrolisados durante a hidrólise com compostos fenólicos, formando quinonas. Porém, apesar da redução, permanece parte desse sabor amargo, que é atribuído à cafeína e teobromina, bem como ao exsudado produzido durante a fermentação. Quanto ao escurecimento da casca após a fermentação, para o cacau foi reportado que esse processo ocorre pela hidrólise dos compostos fenólicos. Os produtos de tal hidrólise são oxidados, durante a secagem por polifenoxidasas e, seus produtos resultantes apresentam coloração marrom escura (BRITO et al., 2004; MATTIETTO, 2001).

Observa-se durante a fermentação a hidrólise específica de proteínas, especialmente as do tipo globulina. Quanto aos aminoácidos livres formados durante a fermentação da amêndoa de cupuaçu foram relatadas aumento dos seguintes aminoácidos: prolina, arginina, leucina, alanina, serina, valina, fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico e isoleucina (LOPES, 2000).

Há também, durante essa etapa, a hidrólise de açúcares, em que a partir da sacarose são obtidos a glicose e frutose. Os açúcares assim como os aminoácidos

livres hidrolisados são os responsáveis pelos precursores de sabor (CARVALHO et al. 2008; LOPES, 2000).

Adicionalmente, as amêndoas são submetidas à secagem após a fermentação e, em seguida ao tratamento térmico, a fim de finalizar as reações responsáveis pela obtenção do aroma e cor característicos do cupulate (COHEN, 2003).

Apesar de seu potencial industrial e da similaridade com o cacau, as sementes de cupuaçu são em sua maioria descartadas, gerando toneladas de resíduos anualmente. Isso ocorre, pois, a gordura extraída da semente do cupuaçu possui um ponto de fusão inferior se comparado ao cacau, o que influencia no produto final e na aceitação deste, isso está relacionado ao fato da fração de ácidos graxos saturados ser menor se comparada a presente no cacau. (SILVA, 1988 e AZEVEDO, 2001). Segundo REISDORFF et al. (2004), outro motivo para uma menor aceitação do cupulate é o fato de o cacau possuir uma quantidade maior de endoprotease aspártica, que hidrolisam as vicilinas (globulinas) quase que completamente em 2 dias de fermentação, enquanto o cupuaçu precisa de um tempo maior para que tal hidrólise ocorra. Portanto, como a hidrólise das proteínas não ocorre completamente, não há obtenção de precursores de sabor e aroma de forma tão rápida como no cacau.

2. OBJETIVOS

Geral: Avaliar o potencial inibitório de hidrolisados proteicos de amêndoas de cupuaçu fermentadas sobre a atividade enzimática da ECA.

Específicos:

Obter concentrados proteicos das amêndoas fermentadas de cupuaçu.

Avaliar o grau de hidrólise do concentrado proteico hidrolisado com pepsina e do autolisado.

Avaliar o potencial inibitório do hidrolisados e do autolisado.

Fracionar e purificar os peptídeos com atividade inibitória sobre a ECA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foram utilizadas amêndoas fermentadas e secas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S) da variedade Redondo provenientes do estado da Bahia e colhidas em março de 2011. O material foi mantido em câmara fria após o fim da fermentação. Antes do uso, cerca de um quilo de material (**Figura 5**) foi descascado e triturado para as análises.

Figura 5 - Amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas.

3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal do material fermentado foi realizada em triplicatas a partir do material triturado. Foram feitas as análises descritas a seguir.

3.2.1 Determinação do teor de lipídeos

A determinação do teor de lipídeos foi realizada conforme a metodologia da AOAC 2003.06, a partir de 2 g de material cujos lipídeos foram extraídos pelo aparelho Soxhlet.

3.2.2 Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas foi realizada conforme a metodologia da AOAC 960.52, a partir de 1 g de material desengordurado.

3.2.3 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada conforme a metodologia da AOAC 925.45, a partir de 1g da amostra pesada em cadinho e mantida em estufa a 105° até peso constante.

3.2.4 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada de acordo com a metodologia 900.2A, a partir de cerca de 2 g de material pesado em cadinho e mantido na mufla a 550° até peso constante.

3.2.5 Determinação do teor de fibras totais

A determinação do teor de fibras totais foi realizada de acordo com o método enzimico-gravimétrico 991.43² da AOAC, a partir da digestão de 1g de material com amilase, protease e amiloglucosidase.

3.3 PREPARO DA AMOSTRA

Amostras de amêndoas de cupuaçu foram descascadas a fim de se obter os nibs (ou seja, o cotilédono da semente). Em seguida, foram moídas no moinho de facas para se obter uma farinha. Em seguida de cerca de 60 g de material foram utilizados para a remoção de lipídeos através da extração no aparelho Soxhlet por 8 horas, com o uso de éter etílico. Após a extração o material desengordurado foi mantido por 12 horas sob

ventilação a fim de evaporar o solvente e, em seguida, mantido em dessecador sob abrigo da umidade.

Posteriormente, foi realizada a extração parcial de alcaloides com clorofórmio no aparelho Soxhlet por 8 horas. Essa etapa foi realizada conforme metodologia proposta por Amin et al. (2002) e Voigt e Biehl (1993). A fim de remover os compostos fenólicos, que têm potencial em inibir a ECA, foram realizadas três lavagens seguidas com a acetona 80% e 0,1% de ácido tioglicólico, na proporção 10:1 de farinha. A cada lavagem a suspensão foi mantida sob agitação a 4°C durante uma hora e posteriormente centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. Posteriormente foram realizadas mais três lavagens com acetona 70% e 0,1 % de ácido tioglicólico, sendo a suspensão mantida em agitação por 30 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Por último foram realizadas duas lavagens com acetato de etila na proporção 10:1, sendo a suspensão mantida sob agitação por 1 hora a 4°C e centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. A farinha desengordurada e isenta de fenólicos obtida foi seca sob fluxo de nitrogênio e armazenada em dessecador sob abrigo de umidade.

3.3.1 Obtenção do concentrado proteico

O concentrado proteico das amêndoas fermentadas foi obtido conforme a metodologia proposta por Carvalho et al. (2009). A farinha desengordurada e isenta de fenólicos obtida na etapa anterior foi diluída em água na proporção 1:15, e o pH foi ajustado para 9 com NaOH 1 N, a fim de solubilizar as proteínas. A solução foi mantida sob agitação por 25°C durante 1 hora, e em seguida a solução foi centrifugada a 4.700 x g por 20 minutos, e o material precipitado descartado. Essa etapa foi repetida mais duas vezes, sendo que o sobrenadante obtido da última repetição teve o pH ajustado para 3,5 e foi mantido sob agitação por 30 minutos a 25 °C. Após centrifugação a 1.500 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido sob agitação em pH 3,5 mais duas vezes e após liofilizado por 24 horas o concentrado proteico foi mantido em dessecador ao abrigo da umidade.

3.3.2 Determinação dos aminoácidos totais

A determinação dos aminoácidos totais para os concentrados proteicos das amêndoas fermentadas foi feita por solicitação de serviço no Laboratório de Fontes Proteicas do Departamento de alimentos e Nutrição na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O método cromatográfico usado foi o descrito por White et al. (1986) e a determinação do triptofano foi feita após a hidrólise enzimática com pancreatina e reação com ácido glioxílico.

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O concentrado proteico foi submetido à hidrólise *in vitro* com pepsina (EC 3.4.23.1, Sigma P7012), enzima esta obtida a partir da mucosa gástrica do porco.

Para a hidrólise enzimática foi utilizada a metodologia proposta por LO e LI-CHAN (2005). O concentrado proteico da amêndoa fermentada foi diluído na proporção 5% (p/v), ou seja, cerca de 500 mg de concentrado proteico foram dispersos em 10 mL de água Mili-Q, e a suspensão foi incubada a temperatura 37°C por 20 minutos. Posteriormente, o pH foi ajustado para 2 com adição HCl 1M e, em seguida a enzima foi adicionada na proporção 1:100 (p/p) em relação ao substrato, o correspondente a 5mg de pepsina.

A reação foi conduzida por 6 horas e, a fim de encontrar o melhor tempo de hidrólise, alíquotas de 1mL foram colhidas desde o tempo 0 a cada hora. Alíquotas foram incubadas em banho de água em ebulição por 10 minutos e, em seguida resfriadas e mantidas a -20°C para a posterior determinação do grau de hidrólise e grau de inibição ECA.

Adicionalmente foi feito um branco da reação, contendo apenas água e enzima, sob as mesmas condições da hidrólise descritas. A fim de verificar também se o meio ácido poderia hidrolisar as proteínas, o concentrado proteico foi diluído apenas com água e simularam-se as condições da hidrólise, como pH e temperatura. Para esses ensaios, alíquotas também foram colhidas em intervalos de 1 hora.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLICRIAMIDA (SDS-PAGE)

Para a determinação do perfil eletroforético das farinhas secas e desengorduradas da semente e da amêndoa fermentada de cupuaçu, bem como do concentrado proteico da amêndoa fermentada e dos hidrolisados e autolisados em diferentes tempos, foi utilizado o método de Laemmli (1970), com algumas modificações.

As amostras de farinha secas e desengorduradas da semente, da amêndoa fermentada de cupuaçu e do concentrado proteico foram dispersas em 1 mL de tampão contendo 42,5 % de água Milli-Q, 12,5% de Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8), 20 % de glicerol, 20 % de SDS, 5% de β -mercaptoetanol e 0,01 % de bromofenol. Os hidrolisados e autolisados tiveram o pH corrigido para 6 pela adição de NaOH 1 N e, em seguida, foram retiradas alíquotas destas amostras contendo aproximadamente 20 μ g de proteína, que foram dispersas no tampão descrito anteriormente na proporção 1:1. Na sequência as amostras foram agitadas em vortex por 5 minutos e aquecidas a 95°C por 5 min. Após resfriamento à temperatura ambiente foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min. A partir do material centrifugado, foram retiradas alíquotas de 10 μ L do material sobrenadante, o equivalente a 20 μ g de proteína.

Para o gel de separação foi utilizado o gel com 15% de acrilamida com 0,75 mm de espessura, que foi disposto em uma cuba vertical de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad), com tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M (pH 8,3) com 0,1 % de SDS (p/v). O marcador de massa molecular utilizado foi o *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (10 a 170 kDa, da Thermo Scientific).

A separação ocorreu sob voltagem constante de (200V) por cerca de 45 min a 4°C. Em seguida o gel foi corado utilizando-se solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% em ácido acético 10 % e etanol 40% por 12 horas e, na sequência o gel foi descorado, de forma a revelar as bandas, com solução descoradora contendo 5% de etanol e 7,5 de ácido acético.

3.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

A determinação do grau de hidrólise foi realizada pela reação colorimétrica do ácido 2,4,6 - trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com o grupo amino dos peptídeos gerados durante a hidrólise enzimática de acordo com o método de Adler-Nissen (1979), essa metodologia adaptada para microplaca conforme Amin et al. (2002).

Para esse ensaio, 15 µL da amostra e do branco da enzima previamente diluídos em SDS 1%, bem como o branco da reação (SDS) foram transferidos para a microplaca, e então adicionados 45 µL de tampão fosfato de sódio (0,2125 M, pH 8,2). Posteriormente, 45 µL de TNBS na concentração 0,05% foram adicionados e a reação foi mantida por 1h a 50°C sob proteção da luz. A reação foi finalizada pela adição de HCl 0,1 M, visto que a reação só ocorre em condições levemente alcalinas.

A leitura foi realizada em comprimento de onda a 340 nm no leitor de microplaca (Synergy H1, Biotek), utilizando para o preparo de curva padrão o aminoácido leucina (0,5 a 2,5 mM). O valor do grau de hidrólise foi calculado pela equação:

$$DH\% = (h / h_{\text{total}}) \times 100\%.$$

onde:

h = número de grupos amino (expresso em mmol.g⁻¹ de proteína) liberados durante a hidrólise calculado a partir da curva padrão e subtraído do valor correspondente da amostra não hidrolisada;

htotal = número total de ligações peptídicas por unidade de massa proteica, obtido a partir da soma de todos os aminoácidos constituintes em mmol.g⁻¹ de proteína.

3.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INIBIÇÃO DA ECA

Para o ensaio da atividade inibitória de ECA, primeiramente a enzima conversora de angiotensina (EC 3.4.15.1, de 0,25 U Sigma A-6778) obtida do pulmão do coelho foi diluída em água Milli-Q a uma concentração de 100mU/ mL, sendo esta armazenada a - 20°C para o uso posterior.

O método utilizado para quantificar a atividade de inibição de ECA foi o proposto por Carmona et al. (2006), usando o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH (também abreviado como Abz-FRK(Dnp)P-OH). O substrato foi diluído em 100 % de DMSO (1mg.mL^{-1}) e sua concentração foi determinada a 365nm, a partir do coeficiente de extinção molar do grupo Dnp ($\epsilon_{365} = 17.300 \text{ M.cm}^{-1}$). Algumas condições para a realização desta análise foram otimizadas por Cruz (2015), como por exemplo, a concentração final do substrato, onde foi apontado que $2 \mu\text{M}$ é a concentração ideal para esta reação. Adicionalmente, no trabalho anteriormente mencionado, para a determinação do grau de inibição da ECA, partiu-se da amostra de hidrolisado proteico contendo cerca de 10 mg de proteína por mL, no entanto, neste trabalho a hidrólise enzimática foi realizada seguindo-se uma metodologia diferente, cuja proporção é de cerca de 50 mg de proteína por mL. Assim, para o ensaio do grau de inibição da ECA, a amostra foi diluída quatro vezes em água Milli-Q.

O ensaio foi realizado em microplaca preta (3915, Corning) com a adição de $150 \mu\text{L}$ de tampão Tris-HCl 0.1M, pH 7, este tampão contendo NaCl (50 mM) e ZnCl_2 (10mM). Foram adicionados $5 \mu\text{L}$ da ECA já diluída e $5 \mu\text{L}$ do hidrolisado proteico ou de tampão, no caso do controle positivo. A microplaca foi pré-incubada por 5 minutos a 37°C e em seguida $5 \mu\text{L}$ do substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH foram adicionados, (chegando-se à concentração de $2 \mu\text{M}$ do substrato). Durante 10 minutos foi monitorada a emissão nos comprimentos de onda 320nm e 420nm, correspondentes ao estado de excitação e emissão, respectivamente.

A emissão de fluorescência foi obtida em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (UAF.min^{-1}). O coeficiente angular da reta da reação em presença dos peptídeos foi dividido pelo coeficiente angular da reta do controle positivo, que representa 100 % de hidrólise pela enzima ECA.

Para se chegar à porcentagem de inibição foram usadas as seguintes relações :

$$\% \text{ atividade enzimática} = (\text{UAF.min}^{-1} \text{ amostra} / \text{UAF.min}^{-1} \text{ controle}) \times 100$$

$$\% \text{ inibição} = 100 - \% \text{ atividade enzimática.}$$

3.8 FRACIONAMENTO DOS PEPTÍDEO POR RP-HPLC

Os hidrolisados proteicos foram ultrafiltrados em membrana de exclusão molecular YM-3 (3kDa, Amicon), as amostras foram centrifugadas a $14.000 \times g$ por 30 min a 10°C . Do material ultrafiltrado, cerca de $250\mu\text{L}$, cerca de $5\mu\text{L}$ desse material foi analisado por metodologia analítica em HPLC em fase reversa (RP-HPLC) (Prominence 20), de forma a verificar a autólise e a hidrólise enzimática. Nessa etapa, foi utilizada uma coluna C_{18} (Ascentis, Supelco) ($250 \times 4,6\text{ mm}$; $5\mu\text{m}$), foram utilizados dois solventes: A (0,1 % de ácido acético em água) e B (0,1 % de ácido acético em 10% de água e 90% de acetonitrila). A eluição ocorreu em um fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com um gradiente de 10 a 100% de B durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi feita em 214 e 280nm. Esta etapa teve caráter apenas analítico, de forma a comparar os perfis dos cromatogramas de ambas as amostras. Para a etapa seguinte, de fracionamento foi utilizado apenas o hidrolisado proteico, esta análise foi realizada partindo-se de cerca de $245\mu\text{L}$ material ultrafiltrado.

O fracionamento foi feito por metodologia semi-preparativa em HPLC de fase reversa RP-HPLC (LC-6AD, Shimadzu Co., Japão). Foi utilizada uma coluna C_{18} (ACE 5) ($250 \times 4,6\text{ mm}$), foram usados dois solventes, conforme descritos anteriormente e a eluição ocorreu em um fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com um gradiente de 10 a 80% de B durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi feita também em 214 e 280nm. As frações foram coletadas manualmente a cada 5 minutos, do tempo 0 até 25 min, totalizando 5 frações (F1 a F5). Em seguida, tais frações foram secas no aparelho Centrivap e ressuspendidas em $350\mu\text{L}$ de água Milli-Q. Posteriormente, foi determinada a atividade de inibitória de ECA correspondente a cada fração.

A fração (F3) apresentou maior inibição da ECA e, portanto, foi submetida à próxima etapa do fracionamento. O sub-fracionamento foi realizado nas mesmas condições e aparelho de HPLC da etapa anterior. Foi utilizada uma coluna C_{18} (ACE) ($250 \times 7,75\text{mm}$), foram usados dois solventes, conforme descritos anteriormente e a eluição ocorreu em um fluxo de $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com um gradiente de 10 a 40% de B durante 20 minutos. A leitura da absorbância foi feita também em 214 e 280nm. Foram coletadas manualmente 4 frações: a partir de 6,7 min até 13,8 min (F3.1); de 13,8 min

a 15,4 min (F3.2); de 15,4 min a 18,5 min (F3.3) e de 18,5 a 22 min (F3.4). Posteriormente, estas sub-frações foram secas em no aparelho CentriVap e em seguida ressuspensas em cerca de 150 μL de água Milli-Q e a atividade inibitória da ECA para cada uma dessas frações foi determinada. Como a sub-fração F3.1 apresentou maior grau de inibição da ECA como diferentes volumes da amostra, esta foi selecionada para a próxima etapa, o sequenciamento por espectrometria de massas.

3.9 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAMENTO *DE NOVO*

Para a etapa de sequenciamento dos peptídeos, as análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, em colaboração com o Dr. Daniel Carvalho Pimenta. Foi usado um espectrômetro do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF) (Shimadzu Co., Japão).

As análises foram realizadas conforme descrito por CRUZ (2015). A subfração F3.1 que apresentou maior atividade inibitória de ECA, foi seca e ressuspensa em 0,5 % de ácido fórmico em água. Posteriormente, a amostra foi inserida diretamente no espectrômetro por injeção manual, em um injetor Rheodyne, a um fluxo de 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, onde 25 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ correspondiam à solução A (0,5 % de ácido fórmico) e 25 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ à solução B (90% de acetonitrila em água e com 0,5 % de ácido fórmico). Para a interface e o detector, as voltagens foram ajustadas respectivamente para 4,5 e 1,76 KV e, a temperatura foi mantida a 200°C. Para o sequenciamento *de novo*, a fragmentação dos peptídeos foi feita utilizando gás argônio, com 50 % de energia. Adicionalmente, para o sequenciamento o íon de interesse foi selecionado em uma janela de massa de 0,5 m/z e fragmentado. Os espectros em modo MS e MS/ MS foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z e, posteriormente analisados pelo software *Peaks Mass Spectrometry* (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá).

3.10 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos (FWVAM, YRLAF, LGYKF e VTTVVTGLTF) identificados na etapa anterior como potenciais inibidores da ECA foram sintetizados pela empresa BIOMATIK (Estados Unidos). O grau de pureza para os peptídeos, conforme informado pela empresa fabricante foi cerca de 98%.

3.11 DETERMINAÇÃO DA IC_{50} E CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K_i)

Para esta etapa foram realizados ensaios de cinética enzimática com os peptídeos sintéticos FWVAM, YRLAF, LGYKF e VTTVVTGLTF que permitiram determinar as respectivas IC_{50} , ou seja, a concentração de cada peptídeo necessária para inibir em 50 % a atividade da ECA, assim como as constantes de inibição (K_i). Para a realização dos ensaios 1 mg de cada peptídeo foi pesado e solubilizado em 1mL de DMSO para os peptídeos YRLAF, LGYKF e VTTVVTGLTF, e no caso do peptídeo FWVAM foi adicionado metanol, como forma evitar a oxidação do aminoácido metionina. Os ensaios foram realizados conforme descrito por CRUZ (2015), sendo as reações conduzidas em cubeta a 37 °C e monitoradas em fluorímetro. Foram adicionados à cubeta 1000 μ L de Tris-HCL 0.1 M (pH 7,0) contendo NaCl (50 mM) e $ZnCl_2$ (10 mM) e, em seguida, foram adicionados 10 μ L do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH (solução estoque de 1,18 mM), sendo ambas as soluções pré-incubadas a 37° C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 5 μ L de ECA (0,5 mU) e a reação foi conduzida por 10 min. A velocidade da reação foi monitorada e expressa em AFU.min⁻¹, e essa foi considerada a velocidade da reação da hidrólise do substrato pela ação da ECA na ausência do peptídeo inibidor (v_0). Posteriormente, outros ensaios foram realizados utilizando-se as mesmas condições descritas anteriormente e adicionando-se cinco diferentes concentrações de cada peptídeo inibidor [I], sendo suas respectivas velocidades de inibição (v_i) determinadas após 10 min de reação.

A relação entre as velocidades de hidrólise do substrato obtidas nas reações em presença ou ausência de cada peptídeo inibidor permitiu determinar a atividade inibitória da ECA utilizando-se as equações anteriormente descritas. As curvas

semilogarítmicas para determinar a atividade inibitória da ECA com diferentes concentrações do peptídeo inibidor e também para obter o valor de IC_{50} foram feitas utilizando o software *Grafit* (versão 3.0, *Erithacus Software*)

Para determinar a constante de inibição (K_i) de cada peptídeo inibidor, foi feito o cálculo conforme o protocolo proposto por Beynon e Bond (2001), baseando-se na seguinte fórmula:

$$v_0/v_i = 1 + [I] / K_{i(app)}$$

Onde:

v_0 = velocidade da hidrólise do substrato (expressa em AFU.min⁻¹) na ausência do peptídeo inibidor, ou seja, essa reação corresponde ao ensaio controle;

v_i = velocidade da hidrólise do substrato na presença do peptídeo inibidor (expressa em AFU.min⁻¹);

[I]= concentração do peptídeo inibidor (expressa em μM);

$K_{i(app)}$ = valor da constante de inibição aparente (expresso em μM)

Essa equação permitiu determinar o $K_{i(app)}$ para cada peptídeo e, a partir desses valores foram determinados os reais valores de K_i , usando-se a seguinte fórmula:

$$K_i = K_{i(app)} / (1 + [S]/ K_m)$$

Onde:

$K_{i(app)}$ = valor da constante de inibição aparente (expresso em μM)

[S]= concentração do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH usado na equação.

K_m = constante de Michaelis, que corresponde ao valor da concentração de substrato equivalente à metade da velocidade máxima (V_{max}) da reação enzimática.

A partir da média dos valores de K_i obtidos para os peptídeos inibidores (FWVAM, YRLAF, LGYKF e VTTVVTGLTF) testados em diferentes concentrações foram determinados os valores de K_i para cada peptídeo.

3.12 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS

A partir dos ensaios de cinética enzimática descritos anteriormente foram determinados também os prováveis tipos de inibição dos peptídeos. Os valores obtidos para a velocidade da hidrólise do substrato (expressa em UFA.min⁻¹) em relação à concentração (μ M) do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH foram analisados pelo software *Grafit* (versão 3.0, Erithacus Software), que determinou os valores de K_m e V_{max} para os ensaios na presença e na ausência do peptídeo inibidor. Adicionalmente, através deste mesmo software foi feita a relação dos duplos recíprocos: $1/v$ em relação $1/[S]$, na equação de Lineweaver-Burk. No gráfico obtido por essa equação a inclinação da reta corresponde a K_m/V_{max} , assim como o ponto que a reta intercepta a ordenada representa a $1/V_{max}$ e o ponto que a reta intercepta a abcissa corresponde a $-1/K_m$. Pela análise dos resultados obtidos foi feita a determinação do tipo de inibição de cada peptídeo.

3.13 ANÁLISE DOS DADOS

Os ensaios da determinação do grau de hidrólise e atividade inibitória da ECA foram realizados em triplicata, os resultados foram expressos como média + desvio padrão. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism software version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A análise estatística foi feita pela análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O critério de significância usado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A fim de caracterizar as amêndoas de cupuaçu usadas para obter o concentrado proteico, foi feita a determinação da composição centesimal do cotilédone e do embrião (nibs). Os resultados obtidos estão na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Composição Centesimal das amêndoas fermentadas e secas e fermentadas/torradas de cupuaçu (g/100g em base úmida)

Componentes	Amêndoa fermentada e Seca*
Lipídeos	60,80 ± 1,03
Proteínas	10,76 ± 0,04
Umidade	4,99 ± 0,07
Cinzas	2,35 ± 0,08
Fibras Totais	12,66
	8,44**

*Média ± desvio padrão

**Carboidratos calculados por diferença.

Os lipídeos destacam-se como o componente com porcentagem mais expressiva, cerca de 61 %, valor este próximo ao obtido para a semente fresca do mesmo lote, com 61,89% (CRUZ, 2015), e é superior aos valores encontrados para amêndoa de cacau fermentada e seca, que apresentou aproximadamente 48% (CRUZ, 2012). Resultado mais próximo foi descrito por Carvalho et. (2009) que obteve para amêndoas de cupuaçu fermentadas e torradas aproximadamente 53% de lipídeos. De fato, por possuir um valor elevado teor de lipídeos e com características semelhantes às do cacau que, a partir das sementes e amêndoas de cupuaçu pode-se obter após a extração uma manteiga com potencial de uso semelhante à manteiga de cacau (QUAST et al. 2007) .

As proteínas correspondem a segunda maior porcentagem, com aproximadamente 10,76%. Valor semelhante aos relatados em outros trabalhos para a semente/ amêndoa de cupuaçu que foram entre 9 a 12% de proteínas (CARVALHO et al. 2005). Esse valor é próximo também ao encontrado para amêndoas fermentadas de cacau, com 11,49% de proteínas (LOPES, 2000). Porém, é inferior a outros materiais, especialmente se comparado a alimentos usado como fonte de peptídeos bioativos, tais como soja ($\pm 40\%$), ou o feijão ($\pm 24\%$) (ALVES et al. 2011; BURRATTO et al. 2009).

As fibras compreendem 12,66 % do total dos componentes, valor este significativo, especialmente se comparado a valores já descritos na literatura para o mesmo material 3,31 % (LOPES, 2000) e 6,51 (CARVALHO et al. 2004). Já a umidade, com cerca de 5%, é semelhante a valores relatados para as amêndoas de cupuaçu e cacau, com valores entre 5 e 7% (LOPES, 2000). E as cinzas representando 2,35% do material, é próximo ao valor encontrado para as sementes frescas desse mesmo lote (2,91%), e para amêndoas de cacau e cupuaçu fermentadas, com 2,05% e 2,32%, respectivamente.

4.2 TEOR DE PROTEÍNAS DO CONCENTRADO PROTEICO

Visto que o termo 'concentrado proteico' compreende materiais com valor superior a 65% de proteínas (UZZAN, 1988), é necessário purificar tal material, removendo os lipídeos, que representam a maior porcentagem do material, e outros interferentes, tais como alcaloides e compostos fenólicos. Embora os alcalóides não possuam quantidades significativas poderiam interferir na determinação das proteínas, superestimando estas, visto que contém nitrogênio em sua molécula (CRUZ, 2015). Procedeu-se também com a remoção dos compostos fenólicos, pois, estes possuem potencial também em inibir a ECA, assim para poder associar a inibição de ECA aos efeitos do peptídeos bioativos estes foram removidos.

Após a remoção dos componentes anteriormente mencionados, o concentrado proteico foi obtido pela solubilização da amostra em pH 9, e em seguida, as proteínas foram precipitadas devido o ajuste para o seu ponto isoelétrico, em pH 3,5. Assim, foi

obtido um concentrado proteico com 81% de proteínas, valores este próximo ao obtido da semente fresca, conforme CRUZ (2015) que obteve 88% de proteínas. Este valor foi semelhante também ao obtido para o concentrado proteico da ervilha com 86 % de proteínas (POWALL et al.2010) e mostrou-se muito superior aos valores obtidos para as sementes de cupuaçu no trabalho de Carvalho et al. 2009, que obteve um valor máximo de 64,33% de proteínas. Tal valor pode ser considerado elevado se comparado ao concentrado obtidos dos feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*) com cerca de 63,8 % de proteínas (UCO et al. 2009) .

4.3 AMINOÁCIDOS TOTAIS

De forma caracterizar o perfil dos aminoácidos das amêndoas foi determinada a composição aminoacídica de cada amostra, os resultados estão expressos na **Tabela 2:**

Tabela 2 – Composição aminoacídica das amêndoas fermentadas. Resultados em g/100g de proteína:

Aminoácido	Amêndoa fermentada e seca
Ácido aspártico	10,15 $\pm$ 0,01
Ácido glutâmico	12,27 $\pm$ 0,01
Serina	4,50 $\pm$ 0,01
Glicina	3,68 $\pm$ 0,01
Histidina	0,39 $\pm$ 0,01
Arginina	6,19 $\pm$ 0,02
Treonina	3,97 $\pm$ 0,07
Alanina	2,38 $\pm$ 0,01
Prolina	3,44 $\pm$ 0,02
Tirosina	3,95 $\pm$ 0,03
Valina	4,48 $\pm$ 0,01
Metionina	0,65 $\pm$ 0,06
Cisteína	2,19 $\pm$ 0,01
Isoleucina	3,93 $\pm$ 0,01
Leucina	6,05 $\pm$ 0,01
Fenilalanina	2,91 $\pm$ 0,25
Lisina	4,75 $\pm$ 0,04
Triptofano	0,47 $\pm$ 0,01
Totais	76,31

O perfil aminoacídico da amêndoa fermentada revela aproximadamente 32% de aminoácidos hidrofóbicos para o concentrado obtido da amêndoa fermentada, que são aminoácidos associados com peptídeos com potencial em inibir a ECA. Devido à fermentação houve redução no teor dos aminoácidos totais em relação à semente fresca, porém, os aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina continuam a ser encontrados em maior quantidade e a histidina e o triptofano são aminoácidos limitantes (CRUZ, 2015). Lopes (2000) e Mattietto (2011) comparam o perfil dos

aminoácidos das sementes e amêndoas de cupuaçu com as de cacau e apontaram que o cupuaçu apresentou valores superiores para vários aminoácidos limitantes. Carvalho et al. (2009) obteve resultados semelhantes para a semente e a amêndoa fermentada e fermentada/ torrada do cupuaçu, porém, no presente trabalho todos os aminoácidos apresentaram um teor reduzido.

O valor dos aminoácidos totais expressos em mmol.g^{-1} para a amêndoa fermentada foi 5,8 e este valor foi usado para o cálculo do grau de hidrólise, como descrito a seguir.

4.4 GRAU DE HIDRÓLISE

Os resultados obtidos para os ensaios de determinação do grau de hidrólise, no ensaio de hidrólise com pepsina durante 6 horas e da autólise da amostra incubada em meio ácido, estão apresentados nas **Figuras 6 e 7**.

Figura 6 – Grau de hidrólise do concentrado proteico para a amêndoa fermentada e seca submetida ao tratamento com pepsina expresso em porcentagem, no período de 6h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$)

O grau de hidrólise do concentrado proteico incubado com pepsina apresentou aumento gradativo ao longo das 6 h de ensaio (**Figura 6**). Para a primeira hora de

ensaio obteve-se 5 % de hidrólise, atingindo o valor máximo em 4 h de ensaio, cerca de 11 % e mantendo este valor até 6 h de incubação. Isto é semelhante à média obtida para o grau de hidrólise descrito por JAKUBCZYK et al. (2013) que após submeter ervilhas a fermentação com *Lactobacillus plantarum* por 7 dias e, posteriormente, hidrolisar esse material com pepsina por 2 h obteve 10,70 % de hidrólise. É semelhante também ao valor obtido para a soja hidrolisada com pepsina por 1 h, que alcançou cerca de 10% de hidrólise (LO e LI-CHIAN, 2005). JAKUBCZYK e BARANIAK (2014) também obtiveram valores aproximados aos obtidos neste trabalho ao hidrolisarem frações de globulina extraídas de ervilhas com pepsina, resultando em 14.42% de hidrólise em 2 horas de ensaio (JAKUBCZYK e BARANIAK, 2014).

Com relação aos valores obtidos para o grau de hidrólise, na literatura é comum encontrar para proteínas de leguminosas e sementes submetidas à incubação com proteases, de 20 a 30 % proteínas hidrolisadas, sendo que valores acima desses são difíceis de serem encontrados. Contudo, Lo e Li-Chian (2005) conseguiram obter 40 % de hidrólise para o isolado proteico da soja após a hidrólise com pepsina seguida de pancreatina. De qualquer forma, apesar de na maioria dos trabalhos serem reportadas baixa proporção de hidrólise, é apontado que, praticamente todas as ligações peptídicas suscetíveis à ação enzimática foram clivadas (INTARASIRISAWAT et al. 2013).

Quanto à amostra incubada em meio ácido (**Figura 7**), tal análise foi conduzida de forma a avaliar se nessa condição ocorreria autólise, ou seja, se o concentrado proteico seria clivado, gerando peptídeos bioativos, sem o emprego de enzimas proteolíticas exógenas. Visto que alterações no pH do meio podem alterar a estabilidade da estrutura proteica e levar à clivagem desta (FINK et al. 1994). Como pode ser observado na **Figura 7**, a partir de 1 h de incubação alcançou-se cerca de 2% de hidrólise, valor este que aumentou discretamente até atingir cerca de 5 % em 6 h. Apesar de não serem observados nesta reação valores acima de 5% para o DH, as amostras foram submetidas à determinação do grau de inibição, de forma a verificar se os peptídeos obtidos após a autólise seriam capazes de inibir a ECA, como apresentado adiante.

Figura 7 – Grau de hidrólise do concentrado proteico para a amêndoa fermentada e seca incubada em pH 2, no período de 6h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$)

4.5 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE E DA AMÊNDOA DE CUPUAÇU E DOS HIDROLISADOS E AUTOLISADOS PROTEICOS

A fim de comparar o perfil proteico da semente fresca e da amêndoa fermentada de cupuaçu, já desengorduradas, do concentrado proteico e do concentrado proteico hidrosilado e incubado em meio ácido, para alíquotas colhidas em diferentes tempos, foi feita a análise dos perfis eletroforéticos em gel de poliacrilamida (**Figura 8**).

Figura 8 - Perfil eletroforético das proteínas em SDS-PAGE a 15% de acrilamida, revelado com Coomassie Brilliant Blue R-250. (1) padrão de massa molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (170 kDa); (2) proteínas da farinha seca e desengordurada da semente fresca de cupuaçu; (3) proteínas da farinha seca e desengordurada da amêndoa fermentada e seca de cupuaçu; (4) concentrado proteico da amêndoa fermentada de cupuaçu; (5) hidrosilado obtido por emprego da pepsina em 3h de ensaio; (6) hidrosilado obtido por emprego da pepsina em 6h de ensaio; (7) hidrosilado obtido após 3h de autólise em pH 2 e (8) hidrosilado obtido após 6h de autólise em pH 2.

O perfil eletroforético da semente fresca demonstrou bandas mais visíveis entre 20 e 40 kDa, e bandas menos intensas entre 40 e 170 kDa como já relatado por CARVALHO et al. 2008 e CRUZ (2015). As proteínas predominantes para a semente de cupuaçu e o cacau são as albuminas e as globulinas, que correspondem a frações com aproximadamente 15, 20, 30 e 40 kDa (CARVALHO et al. 2008, VOIGT et al. 1993), justamente as principais bandas observadas para a semente fresca e a amêndoa de cupuaçu fermentada. O perfil eletroforético do cupuaçu é similar ao do cacau, inclusive com relação às frações de proteicas hidrolisadas durante a fermentação (BUYUKPAMUKCU et al. 2001).

Com relação ao perfil da amêndoa fermentada, esta apresentou uma redução da banda de 30 kDa, que corresponde à fração das globulinas, o que já era esperado pois,

durante o processo de fermentação, é a partir da hidrólise dessa fração que ocorre a formação dos precursores do sabor e aroma característicos do produto final. Adicionalmente, para esta mesma fração houve redução das bandas acima de 40 kDa, o que foi acentuado no perfil eletroforético do concentrado proteico obtido a partir da amêndoa fermentada, o que pode ser relacionado ao processo de remoção dos compostos fenólicos, como já foi apontado por CRUZ (2015). Após o emprego da enzima pepsina em ensaio com o isolado proteico, houve redução das bandas de 30 e 40 kDa, o que pode ser observado no perfil eletroforético do hidrolisado proteico após 3 e 6h de ensaio. No entanto, para a autólise do concentrado proteico incubado em meio ácido não houve a redução das frações proteicas de 30 e 40 kDa.

De modo geral, em todos os perfis eletroforéticos, mesmo com diferentes tratamentos ou tipo de incubação aos quais a amostra foi submetida, não foi possível notar hidrólise das proteínas do tipo albumina, como indicado pela banda de 20 kDa .

4.6 GRAU DE INIBIÇÃO DA ECA

A determinação do grau de inibição da ECA foi realizada empregando o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH para as amostras submetidas aos diferentes tratamentos. Como pode ser observado na **Figura 9**, o concentrado proteico hidrolisado com pepsina não apresentou inibição para o material no tempo 0 (zero) de reação, apesar de o processo de fermentação da semente de cupuaçu levar à hidrólise parcial das proteínas e, conseqüentemente, à formação de peptídeos. Nesse caso, parece que os peptídeos presentes não apresentaram ação inibitória sobre a ECA. No entanto, após uma hora de hidrólise com pepsina houve cerca de 50% de inibição da ECA e para as alíquotas colhidas após 2h esse valor aumentou para cerca de 70%. Para as alíquotas colhidas entre 3 e 6 h de reação, a inibição manteve-se em 60%. Tais valores para o grau de inibição são semelhantes aos obtidos para o concentrado proteico da soja hidrolisado com pepsina que, não apresentou inibição da ECA no tempo 0, mas após ensaio de hidrólise com a pepsina apresentou cerca de 60 % de inibição da ECA (LO e LI-CHIAN, 2005).

Figura 9– Ensaio do Grau de inibição da ECA (expressa em %) para o concentrado proteico de amêndoa fermentada de cupuaçu hidrolisado com pepsina, referente a 0,1,2,3,4,5 e 6 horas de reação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Para o ensaio foi empregado o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$).

O material autolisado em meio ácido (**Figura 10**) apresentou cerca de 2% de inibição da ECA inicialmente (tempo 0 de reação). Para as alíquotas colhidas a partir de 1 a 6 horas de reação o valor médio para a inibição da ECA foi entre 30 % e 40%. Os valores obtidos foram menores do que os encontrados para a amostra incubada com pepsina (**Figura 9**). Contudo, é difícil comparar tais resultados obtidos com outros tipos de amostras, pois, não foi encontrado na literatura valores para o grau de inibição da ECA para outras matrizes proteicas submetidas ao mesmo tratamento, ou seja, hidrolisadas por endoproteases e, posteriormente incubadas em meio ácido.

Figura 10 - Ensaio do Grau de inibição da ECA (expressa em %) para o concentrado proteico de amêndoa fermentada de cupuaçu autolisado meio ácido, referente a 0,1,2,3,4,5 e 6 horas de reação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Para o ensaio foi empregado o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$)

Com o objetivo avaliar se apenas a enzima pepsina poderia apresentar inibição da ECA, foi realizado um ensaio com alíquotas contendo apenas a pepsina incubada em meio ácido (**Figura 11**). Para as alíquotas colhidas nos tempos 0, 1 e 2 horas de reação não houve inibição da ECA. Somente a partir de 3 horas de reação houve alguma inibição da ECA para este material. No entanto, os valores para o grau de inibição nos tempos subsequentes não foram maior que 20% para nenhuma das alíquotas. Também não foi possível comparar esses resultados com outros tipos de amostra, pois também não há referências na literatura.

Figura 11 - Ensaio do Grau de inibição da ECA (expressa em %) para a pepsina em meio ácido, referente a 0,1,2,3,4,5 e 6 horas de reação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Para o ensaio foi empregado o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$)

Considerando-se os valores obtidos para o grau de hidrólise e para a atividade inibitória da ECA, a amostra submetida a 1 h de hidrólise com pepsina foi escolhida para o fracionamento, visto que não houve diferença significativa entre 1 e 6 h de reação. Adicionalmente, com um tempo menor de reação da enzima, é reduzida a possibilidade da formação peptídeos com 2 ou 3 aminoácidos e maiores as chances de obter peptídeos com mais aminoácidos, o que não seria interessante pois na literatura é descrito de forma extensiva que peptídeos com sequências curtas com 2 ou 3 aminoácidos, com as características de especificidade descritas anteriormente, são potentes inibidores da ECA. É importante salientar também que a atividade inibitória da ECA para a amostra colhida em 1 h de reação não foi tão inferior ao observado para alíquotas colhidas posteriormente, entre 60 a 70 % de inibição. Assim, as amostras hidrolisadas e autolisadas em 1 h de reação foram submetidas à análise em RP-HPLC, para separar os peptídeos formados.

4.7 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA

Após as amostras resultantes da hidrólise e da autólise serem ultrafiltradas em membrana de exclusão molecular de 3Da, elas foram, em seguida, separadas por RP-HPLC. Essa análise permitiu comparar o perfil cromatográfico das amostras, com relação à clivagem das proteínas do concentrado proteico. Pode-se observar no perfil cromatográfico do autolisado e do hidrolisado proteico demonstrados na **Figura 12** que, a amostra incubada apenas em meio ácido (linha rosa) apresentou sinal com intensidade no UV muito baixa, próxima à linha de base, diferindo significativamente do hidrolisado proteico (linha preta). Esse perfil cromatográfico demonstra que a autólise em meio ácido não foi tão eficiente em clivar as proteínas se comparada ao perfil cromatográfico do hidrolisado proteico. Esse resultado é concordante com os do grau de hidrólise e da atividade inibitória da ECA para a amostra autolisada, que apresentou valores inferiores se comparados aos obtidos para o concentrado incubado com a pepsina. Portanto, para as etapas de fracionamento e purificação prosseguiu-se apenas com o hidrolisado proteico.

Figura 12 – Perfil cromatográfico do hidrolisado e do autolisado proteico separados RP-HPLC utilizando coluna C₁₈ (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m). A eluição foi realizada com um gradiente de 10 a 100 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido acético com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A detecção da absorbância foi realizada em 214 e 280 nm.

Na **figura 13** está representado o perfil do hidrolisado proteico analisado sendo coletadas frações a cada 5 min. Alguns picos de baixa intensidade de UV foram detectados em cerca de 2 min de corrida, porém, picos mais pronunciados foram detectados somente nas frações F3 e F4, entre 15 a 20 min, quando a proporção do solvente orgânico é maior, de acordo com o gradiente empregado. Assim, F3 e F4 consistiram em frações mais hidrofóbicas, se comparadas às frações F1 e F2.

Figura 13 – Perfil cromatográfico do hidrolisado proteico da amêndoa de cupuaçu separado por RP-HPLC, utilizando coluna C_{18} (ACE 5) (250 x 4.6 mm). A eluição da fração foi realizada com gradiente de 10 a 80 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido acético com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A detecção da absorbância foi realizada em 214 e 280 nm. As frações foram coletadas a cada 5 min, perfazendo no total cinco frações (F1-F5).

Foi realizado posteriormente o estudo biomonitorado da atividade inibitória da ECA, onde todas as cinco frações foram analisadas empregando o ensaio de fluorescência (substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH) e utilizando diferentes volumes das frações coletadas. De forma geral, as diferentes frações apresentaram valores distintos quanto à atividade inibitória da ECA de acordo com diferentes volumes empregados no ensaio, sendo que o valor máximo alcançado foi de aproximadamente 50%. Na **Figura 14** pode ser observado que para as frações F1 a F5, quando foi utilizado $4 \mu\text{L}$ de amostra, os valores de inibição foram entre 30 a 50%. No entanto, com a redução do volume de amostra para $2 \mu\text{L}$, os valores para a inibição da ECA ficaram entre 20 a 30%. Quando se utilizou $1 \mu\text{L}$ de amostra, somente as frações F2 e F3 apresentaram inibição significativa, o que foi semelhantes ao observado quando utilizou-se apenas $0,5 \mu\text{L}$ de amostra. Apesar de ambas as frações apresentarem efeito inibidor evidente, pelo

fato da F3 ter característica mais hidrofóbica em relação a F2 e, portanto, com possibilidade maior de conter peptídeos bioativos com potencial em inibir a ECA, essa fração (F3) foi selecionada para o sub fracionamento.

Figura 14 – Perfil de atividade inibitória da ECA (%) de cinco frações separadas (F1- F5). Para o ensaio foi empregado o método de fluorescência com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH), foram utilizados diferentes volumes de cada fração nos ensaios. Os valores correspondem a média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Na **Figura 15** está representado o perfil cromatográfico do subfracionamento da fração F3. Foram colhidas 4 subfrações: F3.1 (6.7 - 13.8 min); F3.2 (13.8 - 15.4 min); F3.3 (15.4 - 18.5 min) e F3.4 (18.5 - 22 min). A subfração F3.1 apresentou sinal de absorbância no UV mais baixo se comparada as outras frações, já a F3.2 apresentou um pico mais intenso, seguido pela F3.4. e a F3.3. Essas frações foram analisadas quanto a atividade inibitória da ECA, utilizando-se diferentes volume de amostras conforme apresentado na figura **Figura 15**.

Figura 15 – Perfil cromatográfico semi-preparativo do subfracionamento da F3 por RP- HPLC, utilizando coluna C_{18} (ACE) (250 x 7,75mm). A eluição foi realizada com gradiente de 10 a 40 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido acético com um fluxo de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A detecção da absorbância foi realizada em 214 e 280 nm. As frações foram coletadas de 6.7 a 22 min, perfazendo um total de quatro subfrações.

Os valores para o grau de inibição da ECA apresentados na **Figura 16** revelam que a F3.1 apresentou inibição significativamente maior em relação as outras subfrações. Com $4 \mu\text{L}$ de amostra, por exemplo, esta subfração teve cerca de 50 % de inibição, enquanto que as demais frações com o mesmo volume de amostra apresentaram cerca de 20%. O mesmo pode ser observado com $2 \mu\text{L}$ de amostra, em que a F3.1 apresenta valores pronunciados para atividade inibitória (cerca de 30%), enquanto que as demais frações apresentam aproximadamente 5%. Assim, a F3.1 foi escolhida para a próxima etapa, de identificação de sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas.

Figura 16 - Perfil de atividade inibitória da ECA (%) de quatro subfrações coletadas de F3 (F3.1 – F3.4) por RP-HPLC. Para o ensaio foi empregado o método de fluorescência com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH), sendo utilizados diferentes volumes de cada sub fração nos ensaios. Os valores correspondem a média $\pm$ desvio padrão padrão (n=3).

4.8 SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA

Para a etapa de sequenciamento dos peptídeos foi realizada a separação cromatográfica acoplada à espectrometria de massas (LC-MSMS). A subfração F3.1 apresentou a presença de mais de um peptídeo, pois como pode ser observado na **Figura 17**, tanto o cromatograma com absorbância monitorada a 214 nm como o cromatograma de íons ou TIC (do inglês= total ion count) apresentaram vários picos.

Figura 17 – (A) Perfil cromatográfico da subfração F3.1 monitorada a 214 nm (detecção em série), (B) cromatograma de íons (TIC).

Conforme apresentado no cromatograma de íons (**Figura 17**) vários íons foram detectados na subfração F3.1, dentre esses quatro principais foram identificados entre 15 e 20 min de retenção, sendo posteriormente selecionados, fragmentados e identificados pelo sequenciamento *de novo*. Os espectros correspondentes a esses íons estão demonstrados nas **Figuras 18 a 21**. Os peptídeos apresentaram dois sítios de ionização.

Figura 18 - Sequenciamentos do peptídeo YRLAF obtidos a partir da subfração F3.1 (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica dos íons no tempo de retenção 15,4 min. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo* do peptídeo YRLAF.

Como representado na **Figura 18** a partir do íon com relação m/z 670 foram identificados o peptídeo YRLAF. O maior peptídeo sequenciado para a subfração F3.1, VTTVVTGLTF, foi identificado em seguida no tempo de retenção 19,7 min, esse íon possui relação m/z 1039 (**Figura 19**).

Figura 19 - Sequenciamentos do peptídeo VTTVVTGLTF obtido a partir da subfração F3.1. (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica dos íons no tempo de retenção 19,71. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo* do peptídeo VTTVVTGLTF.

No tempo de retenção de 19 min foi identificado outro peptídeo, FWVAM, a **Figura 20** demonstra o íon principal desse o peptídeo cuja relação m/z deste é 654. O quinto e último peptídeo sequenciado a partir da subfração F3.1, LGYFK, foi identificado em 20 min de retenção a representação para os espectros desse peptídeo estão na **Figura 21**.

Figura 20 - Sequenciamentos do peptídeo FWVAM obtido a partir da subfração F3.1. (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica dos íons no tempo de retenção 19,8. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo* do peptídeo FWVAM.

Figura 21 - Sequenciamento do peptídeo LGYKF obtido a partir da subfração F3.1. (A) Espectro em modo MS mostrando a distribuição isotópica do íon no tempo de retenção 20,3. (B) Espectro em modo MS/MS processado e interpretado do sequenciamento *de novo*.

A **Tabela 3** contém as sequências peptídicas identificadas e suas respectivas estruturas e massas moleculares dos quatro peptídeos identificados. Dentre os quatro novos peptídeos identificados a partir da subfração F3.1, através do sequenciamento *de novo*, três possuem cinco aminoácidos e um possui 10 aminoácidos em sua sequência. Como anteriormente comentado, o sítio ativo da ECA consegue ligar-se apenas a peptídeos de sequências curtas e que, conseqüentemente, possuem baixas massas moleculares.

Tabela 3 – Peptídeos identificados da subfração 3.1, obtida do hidrolisado da amêndoa de cupuaçu fermentada, com suas respectivas sequências e massas moleculares.

Peptídeo	Massa molecular
FWVAM	652,3 Da
YRLAF	668,4 Da
LGYKF	626,3 Da
VTTVVTGLTF	1036,6 Da

Uma vez identificadas as sequências peptídicas, foram feitas buscas com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, que permite investigar a ocorrência de sequências peptídicas similares e, portanto, de quais proteínas essas sequências poderiam ser originadas. Nessa busca, o objetivo foi investigar qual proteína de reserva da semente de cupuaçu poderia originar cada peptídeo a partir de endoproteases durante a fermentação e após a incubação com pepsina.

Essas análises foram realizadas procurando-se as sequências identificadas para as proteínas já sequenciadas para as sementes do gênero *Theobroma*, tanto para o cupuaçu e quanto o cacau. A busca realizada em relação às proteínas da semente de cupuaçu apontaram que duas sequências peptídicas, YRLAF e VTTVVTGLTF, apresentaram similaridade com sequências identificadas para a proteína vicilina. No caso do peptídeo YRLAF, este apresentou uma probabilidade maior de pertencer a duas proteínas do tipo vicilina, identificadas pelas sequências de acesso AAF13474.1 e

* <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

AAF13473.1, pois teve um e-value (abreviação do inglês para expected value) de 0,23 para ambas enquanto o peptídeo VTTVVTGLTF de 212. Para o peptídeo YRLAF os alinhamentos ocorreram entre os aminoácidos 23 e 26 de ambas as proteínas, já o peptídeo VTTVVTGLTF também identificado com duas proteínas vicilinas (AAF13474.1 e AAF13473.1), apresentou alinhamento entre os aminoácidos 57 e 58 dessas proteínas. Em relação ao e-value, quanto menor seu valor maiores são as chances da sequência proteica pertencer à proteína apontada. Assim, a probabilidade da sequência peptídica YRLAF estar de fato inserida nas proteínas do tipo vicilinas para a semente de cupuaçu é bem maior do que o peptídeo VTTVVTGLTF. As outras sequências peptídicas identificadas nesse estudo ou não apresentaram similaridades com proteínas da semente ou foram identificadas apenas em sequências proteicas curtas ou não proteínas de reserva. Contudo, é importante lembrar que isso pode ter ocorrido porque nem todas as proteínas de reserva do cupuaçu foram sequenciadas.

Para a busca das sequências em relação às proteínas da semente de cacau, o peptídeo LGYKF apresentou similaridade com um trecho da proteína de reserva albumina(identificada como :prf||1802409), com um e-value de 16, alinhando-se entre os aminoácidos 145 e 149 dessa proteínas. As outras sequências peptídicas identificadas no estudo também foram localizadas em pequenos fragmentos proteicos das proteínas do cacau.

Conforme anteriormente mencionado, segundo a literatura, são as globulinas as proteínas de reserva do cupuaçu e do cacau mais suscetíveis a serem hidrolisadas pela ação de endoproteases durante a fermentação e que levam à formação dos precursores de sabor e aroma característicos do chocolate ou do cupulate. Sendo assim, os resultados obtidos para a busca dessas sequências peptídicas na plataforma BLAST, diferiram do que era esperado.

Adicionalmente, além da busca pelas potenciais proteínas de origem as sequências peptídicas identificadas foram submetidas à análise *in silico* contra o banco de dados BIOPEP, sendo que cada sequência peptídica foi submetida à análise com a ferramenta “perfil de atividade biológica potencial”. Os quatro peptídeos identificados não foram apontados como peptídeos com potencial em inibir a ECA ou coincidiram

com sequências já identificadas. No entanto, algumas sequências peptídicas menores, e que estão presentes nos peptídeos YRLAF, LGYKF e VTTVVTGLTF, foram apontadas como inibidoras da ECA (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Peptídeos identificados da subfração 3.1, obtida a partir do hidrolisado da amêndoa de cupuaçu fermentada e sequências peptídicas já identificadas como inibidoras da ECA disponíveis no banco de dados BIOEP*.

Peptídeos	Sequências peptídicas inibidoras da ECA	IC ₅₀ (μM)	Referências
YRLAF	RL	2,439	FITZGERALD e MEISEL, 1999
	AF	190	CHEUNG et al., 1980
	LA	1,523	CUSHMAN, 1981
LGYKF	GY	210	CHEUNG et al., 1980
	LG	8,800	CHEUNG et al., 1980
	GYK	160	MEISEL et al., 2006
	KF	28,30	MEISEL et al., 2006
	YK	610	MEISEL et al., 2006
VTTVVTGLTF	GL	2,500	CHEUNG et al., 1980
	TG	2,000	CHEUNG et al., 1980
	LTF	330	MEISEL et al., 2006
	TF	18	NOGATA et al., 2009

*MINKIEWICZ et al., 2008.

Todos os peptídeos identificados apresentaram aminoácidos hidrofóbicos entre as 3 últimas posições do C-terminal, sendo que alguns dos peptídeos possuem somente esse tipo de aminoácido na parte C-terminal, como é o caso do peptídeos YRLAF e FWVAM. Adicionalmente, comparando-se os peptídeos obtidos neste trabalho com os obtidos a partir da semente de cupuaçu fresca de mesmo lote, as sequências peptídicas obtidas foram diferentes, porém, em ambos os casos os peptídeos

identificados apresentaram às características anteriormente descritas (CRUZ, 2015), o que está de acordo com o observado na literatura, pois, como já descrito, é apontado que a parte C-terminal do peptídeo é responsável pela ação inibitória e que são os aminoácidos hidrofóbicos nessa posição os que causam a inibição da ECA. Apenas o peptídeo FWVAM não foi apontado como possível inibidor na ECA ou apresentou sequências peptídicas com o mesmo potencial, após busca no site BIOPEP. Contudo, isso pode ter ocorrido por não haver ainda peptídeos identificados que possuam as sequências contidas nesse peptídeo e que tenham apresentado potencial em inibidor a ECA.

Dentre as sequências peptídicas contidas nos peptídeos identificados, pode-se destacar o dipeptídeo TF, cujo valor para a IC_{50} é 18 μ M. Simulando-se a ação de enzimas gastrointestinais (pepsina, tripsina e quimotripsina) sobre o peptídeo VTTVVTGLTF a partir da ferramenta “Ação da Enzima” disponível no BIOPEP, seria possível obter esse mesmo dipeptídeo (**Tabela 5**). Os outros peptídeos também foram submetidos a essa análise *in silico* e os resultados estão descritos na **Tabela 5**:

Tabela 5 – Análise *in silico* da ação de enzimas gastrointestinais sobre os peptídeos sintetizados, a partir da ferramenta “ação da enzima” disponível no BIOPEP*.

Peptídeo inibidor	Fragmentos da ação das enzimas: pepsina+ tripsina + quimotripsina
YRLAF	Y - R - L - AF
VTTVVTGLTF	VTTVVTGL - TF
LGYKF	L - GY - K - F
FWVAM	F - W - VAM

*MINKIEWICZ et al., 2008.

Conforme demonstrado nessa análise seriam liberados aminoácidos ou sequências di- ou tri- peptídicas das regiões N e C terminal dos diferentes peptídeos, com exceção do fragmento VTTVVTGL, indicando que esses possivelmente não seriam resistentes à digestão *in vivo*. Contudo, assim como o diptídeo TF, contido no peptídeo

VTTVVTGLTF e já identificado como inibidor da ECA, o diptídeo AF provalmente seria liberado dos peptídeos YRLAF e resistiria à ação dessas enzimas. Apontando assim para o potencial em inibir a ECA com o uso do concentrado proteico da amêndoa de cupuaçu hidrolisado com pepsina.

Desse modo os peptídeos sintetizados “*in vitro*”, foram submetidos ao estudo da inibição da ECA.

4.9 DETERMINAÇÃO DA IC_{50} E DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K_i)

A partir dos ensaios de cinética enzimática com diferentes concentrações dos peptídeos inibidores foram determinados os valores de IC_{50} para cada peptídeo sintético. As curvas semi-logarítmicas para a determinação da IC_{50} em relação à atividade inibitória da ECA estão representadas na **Figura 22**. É possível constatar que mesmo em baixas concentrações os peptídeos apresentaram inibição e o peptídeo VTTVVTGLTF foi o que apresentou maior atividade inibitória da ECA. Já os peptídeos YRLAF e LGYKF tiveram valores semelhantes para a inibição da ECA. Esses perfis estão de acordo com os valores obtidos para a IC_{50} e K_i desses peptídeos (**Tabela 5**), pois o peptídeo VTTVVTGLTF apresentou os menores valores de IC_{50} e K_i .

Figura 22 – Curvas semilogarítmicas da determinação da IC_{50} relativa à atividade inibitória da ECA. Os valores foram obtidos a partir de diferentes concentrações (expressos em μM) dos peptídeos sintéticos: YRLAF (A), VTTVVTGLTF (B), FWVAM (C), LGYKF (D).

Os valores obtidos para a IC_{50} variaram de 0,70 a 11,11 μM (**Tabela 6**), os quais podem ser apontados como baixos se comparados aos valores apresentados por outros peptídeos obtidos de proteínas alimentares também hidrolisadas com pepsina e testados quanto à inibição da ECA. Esse é o caso dos peptídeos: NIFYCP (FUJITA et al. 2000), YNKL, FAL, YKYY (SUETSUNA e NAKANO, 2000), WLAHK (CHEN, 2001), KFYG (PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al. 2000), que apresentaram valores de IC_{50} entre 15 a 90 μM .

Tabela 6 – Valores de IC_{50}^* e de constante de inibição (K_i) dos peptídeos sintéticos.

Peptídeo inibidor	IC_{50}^* (μM)	K_i (μM)
YRLAF	4.73	9.14
VTTVVTGLTF	0.70	2.79
LGYKF	11.11	8.15

*Concentração de inibidor necessária para inibir em 50% a atividade da ECA.

O valor de IC_{50} para o peptídeo YRLAF foi de 4,73 μM e para a K_i foi de 9.14 μM . O peptídeo VTTVVTGLTF destaca-se entre os quatro peptídeos analisados por apresentar os menores valores da IC_{50} quanto do K_i . Como mencionado anteriormente a sequência contida na porção C- terminal desse peptídeo (LTF) já foi identificada como inibidora da ECA, e por conter de mais de um resíduo de natureza apolar isso pode estar relacionado com o significativo efeito inibidor

No entanto, o peptídeo FWVAM não apresentou inibição da ECA, pois, a inibição diminuiu com o aumento da concentração do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Nesse caso o FWVAM parece atuar como um substrato que ao ligar-se a ECA, impede que essa hidrolise o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Por esse motivo não foi possível determinar a IC_{50} e o K_i desse peptídeo.

De modo geral, pode-se afirmar que os peptídeos isolados no presente estudo apresentaram valores de IC_{50} e K_i menores que os obtidos para a semente fresca de cupuaçu de mesma origem (CRUZ, 2015), incluindo o peptídeo LGYKF, que apresentou o maior valor para a IC_{50} (11,11 μM). Os peptídeos identificados a partir dos hidrolisados originados de isolados proteicos da semente fresca apresentaram valores de IC_{50} que variaram de 3 a 131 μM . Isso pode indicar que o processo de fermentação pode ter influenciado de forma positiva na obtenção peptídeos com potencial em inibir a ECA.

4.10 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A maioria dos peptídeos com atividade inibitória sobre a ECA é descrita na literatura como sendo de peptídeos inibidores do tipo competitivo. Contudo, alguns trabalhos apontam que esses peptídeos podem ser também do tipo acompetitivo ou mistos (NELSON e COX, 2002). Nesse sentido, de forma a investigar os prováveis mecanismos relativos aos peptídeos em estudo, foi feita a análise dos respectivos plots dos duplos recíprocos, também conhecido como gráfico de Lineweaver-Burk, no qual é possível identificar o mecanismo de inibição pela forma como os ensaios na ausência e presença de peptídeo inibidor afetam a inclinação e das retas. Adicionalmente, a alteração ou não dos valores de K_m e V_{max} em relação ao ensaio controle (sem inibidor) determina o tipo de inibição.

Os resultados obtidos apontaram que os peptídeos analisados apresentaram inibição dos tipos competitiva e acompetitiva, como pode ser notado nas **figuras 23, 24, 25**.

Figura 23 : Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de cinética de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 μM) na ausência (—○—) e na presença de peptídeo inibidor YRLAF nas concentrações 0,8 μM (—△—), 1,61 μM (—□—), 3,23 μM (—■—) e 4,85 μM (—●—).

Nos ensaios realizados foi possível determinar pelo gráfico de Lineweaver-Burk que o peptídeo YRLAF inibe de forma competitiva a ECA (**Figuras 23**). Esse peptídeo liga-se ao sítio ativo da ECA impedindo que essa se ligue ao seu substrato. Como resultado desse tipo de ligação do peptídeo inibidor há o aumento da K_m , mas a V_{max} não se altera, pois quando a concentração do substrato passa a ser maior que a concentração do peptídeo inibidor a reação torna-se mais favorável ao substrato e há redução da probabilidade do inibidor ligar-se a enzima, ou seja, o valor de V_{max} é o mesmo apresentado na ausência de inibidor. Na **Figura 23** observou-se também o aumento da K_m para 5 μM na reação com 4,85 μM do peptídeo YRLAF, caracterizando a inibição do tipo competitiva. Exemplos de peptídeos de origem alimentar, no caso o leite, e que possuem o mesmo tipo de inibição, competitiva, são os peptídeos LNVPGEIVE, NIPPLTQTPV e DKIHFP (YU et al 2006). Byun e Kim (2002) apontou que nesse tipo de inibição a região C-terminal dos peptídeos provavelmente interage com o subsítios S, S1' e S2' da ECA, impedindo-a de ligar-se ao seu substrato.

Em contraste os peptídeos LGYKF e VTTVVTGLTF apresentaram inibição do tipo acompetitiva, conforme demonstrado nas Figuras 24 e 25.

Figura 24: Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de cinética de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (---○---) e na presença de peptídeo inibidor LGYKF nas concentrações 1,1 μM (---◻---), 2,2 μM (---◼---), 4,4 μM (---▲---), 6,6 μM (---◴---), 8,7 μM (---●---).

Figura 25: Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de cinética de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (○) e na presença de peptídeo inibidor VTTVVTGLTF nas concentrações 0,61 μM (▲), 1,23 μM (△), 2,46 μM (■), 3,7 μM (□) e 5 μM (●).

Neste tipo de inibição o inibidor liga-se ao complexo enzima-substrato, assim, ele não impede a interação da enzima com seu substrato, no entanto, há alterações que impedem a formação do produto e, como consequência, há a diminuição da $V_{\max}$ e da K_m . Pode-se destacar que para ambos os peptídeos foram obtidas retas paralelas no gráfico de Lineweaver-Burk, caracterizando assim a inibição do tipo incompetitiva. Nos gráficos apresentados nessas figuras foram observados esses efeitos, como, por exemplo, para o peptídeo LGYKF (**Figura 27**), que reduziu a $V_{\max}$ em cerca de 50% quando a concentração do peptídeo foi de 4,4 μM, se comparada à reação sem inibidor. De forma análoga, houve diminuição da K_m para a cinética realizada em presença do inibidor. As mesmas alterações foram observadas na cinética em presença do inibidor VTTVVTGLTF.

O mesmo tipo de inibição foi observado para os peptídeos GGSGNY, DLKLP, GSSDNR, MRDLK e HNTPSR, obtidos também de outro alimento, a ervilha (JAKUBCZYK e BARANIAK, 2014).

5. CONCLUSÕES

A partir das amêndoas fermentadas de cupuaçu foi possível obter um concentrado proteico com significativo teor de proteínas, que foi de 81%, e este, após ser hidrolisado com pepsina, resultou em um hidrolisado proteico que inibiu em 50% a ECA.

Através do fracionamento do hidrolisado proteico por RP-HPLC foram identificados quatro novos peptídeos: YRLAF, VTTVVTGLTF, FWVAM E LGYKF. Dentre estes, três inibiram a ECA enquanto o quarto peptídeo serviu como substrato dessa enzima, competindo com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Os três peptídeos com atividade inibitória apresentaram IC_{50} entre 0.70 e 11.11 μ M e K_i entre 2.79 e 9.14 μ M, os quais podem ser considerados valores baixos se comparados a peptídeos inibidores obtidos a partir de outros alimentos.

Apesar dos resultados promissores obtidos nas análises *in vitro*, a demonstração do potencial efeito anti-hipertensivo dos peptídeos identificados nesse estudo ainda depende de uma avaliação *in vivo*, a ser desenvolvida futuramente. Não obstante essa lacuna, o presente trabalho traz uma contribuição importante ao demonstrar o potencial do cupuaçu como matéria-prima promissora quanto à obtenção de peptídeos com ações biológicas benéficas, o que reforça, também, a importância de melhor explorar o potencial de aproveitamento de alimentos descartados ou considerados resíduos.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, A. M.; KIM, M.; SATO, K. Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin, Bioactive Food Peptides in Health and Disease. In: **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. InTech, 2013.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262,1979.
- ALEIXANDRE, A.; MIGUEL, M. Food Peptides as Antihypertensive Agents. In: HETTIARACHCHY, N. S.; SATO, K.; MARSHALL, M. R.; KANNAN, A. **Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health**. cap.6 p.131-163. ISBN eBook: 978-1-4200-9317-9. 2011.
- ALVES, F.; OLIVEIRA, M.; MANDARINO, J. M., BENASSI, V., LEITE, R.; SEIBEL, N. Composição centesimal de grãos de soja de oito diferentes cultivares. **Documentos**, **328**. VI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. p.7-9, 2011.
- ALVES, M. F.; ARAUJO, M. C. JULIANO, M. A.; OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J.E. ; CASARINI, D.E. ; JULIANO, L.; CARMONA; A.K. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n.6, 861-868, 2005.
- AMIN, I.; JINAP, S; JAMILAH, B.; HARIKRISNA, K.; BIEHL, B.; Oligopeptide patterns produced from Theobroma cacao L of various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.82, n.7, p. 733–737, 2002.
- ARAGÃO, C.G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo**. Manaus. 115p. 1992. Dissertação (Mestrado). Fundação Universidade do Amazonas, 1992.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International.**, 16ª ed., Arlington, 2 v, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International.**, 17ª ed., Gaithersburg, 1-2 v, 2000.
- AZEVEDO, A. B. A. Extração e Fracionamento da Gordura de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). 2001. 108f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Campinas. 2001.
- BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**. v.18, n.2, p. 67-79, 2011.
- BEYNON, R.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. Oxford University, 2 ed., 2001.

BOYE, J.I.; ROUFIK, S.; PESTA, N.; BARBANA, C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. **LWT-Food Science and Technology**, v.43, n.6, p.987-991, 2010.

BRITO, E.S.; GARCÍA, N.H.P.; AMÂNCIO, A.C. Use of a proteolytic enzyme in cocoa(*Theobroma cacao* L.) processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n.4, p. 553-558, 2004.

BUYUKPAMUKCU, E.; GOODALL, D. M.; HANSEN, C. E.; KEELY, B. J.; KOCHHAR, S.; WILES, H. Characterization of Peptides Formed during Fermentation of Cocoa Bean. **J. Agric. Food Chem**, v.49, p. 5822–5827, 2001.

BYUN, H. G.; KIM, S. K. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan Pollack skin. *J. Biochem. Mol. Biol.* v. 35, n.2, p. 239–243, 2002.

CARMONA, A. K.; SCHWAGER, S. L.; JULIANO, M. A.; Juliano, L.; STURROCK, E. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. **Nature Protocols** n.1, p.1971 – 1976, 2006.

CARNEVALE, F. C.; MOREIRA, A. M.; PINTO, R. A. P.; BORGES, M. V.; Elkis, H. Indicações do Tratamento Endovascular nas Estenoses da Artéria Renal. *Rev Bras Cardiol Invas*, v.14, n.1, p. 76-81, 2006.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J.A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p. 986-993, 2008.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; WADA, J. K. A. Caracterização físico-química e curvas de solubilidade protéica de sementes, amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.2, p. 127-134, 2005.

CARVALHO, A.V.; GARCIA, N.H.P.; FARFÁN, J.A.; WADA, J. K. A. Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 01-08, 2009.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém, 5ª ed., Museu Paraense Emilio Goeldi, Edições Cejup; CNPQ. p.90-96, 1991.

CEPLAC. Comissão executiva do plano de lavoura cacauaieira: normas técnicas para o cultivo do cacau no recôncavo baiano. Ilhéus, CEPLAC/ CEPEC. 43p. 1980.

CHEUNG H. S., WANG F.-L., ONDETTI M. A., Sabo E. F., Cushman D. W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, v 255, p. 401-407, 1980.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. C.; BARIANI, A.; RODRIGUES, J. V. F.C.; PANDO, S. C. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em

sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. **Acta Amazonica**. v.39, n.1. p. 199-206, 2009.

CHEUNG, I.W.Y.; NAKAYAMA, S.; HSU, M.N.K.; SAMARANAYAKA, A.G.P.; LI-CHAN, E.C.Y. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by *In Silico* and *In Vitro* analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57,n.19, p.9234-9242, 2009.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **Hypertension**, v.42, n.6, p.1206-52, 2003.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**. v.65, n. 1, p.1-12, 2012.

COHEN, K. O.; MATTIETTO, R.; JACKIX, M. N. Processo de Torração das Amêndoas e Nibs de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa**, n.35, 21 p., 2004.

COHEN, K.C. **Estudo do processo de temperagem do chocolate ao leite e de produtos análogos elaborados com liquor e gordura de cupuaçu**. 2003, 296p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. 2003.

CRUZ, J. F.M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. 101f. Dissertação. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2012.

CRUZ, J. N. **Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I**. 2014. 101f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015

CUNHA, C. R.; JACKIK, M. N.H.; CORTELAZZO, A.; VASCONCELOS, M.A.M. Alterações na microestrutura das amêndoas durante a fermentação de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). In: **II Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**, 14 de novembro de 1997. Campinas – SP

CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H.S. (1972) Studies *in vitro* of angiotensin-converting enzyme of lung and other tissues. In: **Hypertension**-, p. 532. Ed. Genest, J. & Koiw, E. Springer, Berlin. 1972

DAREWICZ, M.; BORAWSKA, J.; VEGARUD, G.; MINKIEWICZ, P.; IWANIAK, A. Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity and ACE Inhibitory Peptides of Salmon (*Salmo salar*) Protein Hydrolysates Obtained by Human and Porcine Gastrointestinal Enzymes. **Int J Mol Sci.**, v.15, n.8, p.14077–14101, 2014.

DURAK, A.; BARANIAK, B.; JAKUBCZYK, A.; SWIECA, M. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2177–2183, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Árvore do conhecimento**. 2017. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html>. acessado em 16/03/2017.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. v.24, n.1, p.163–169, 1965.

FIGUERÊDO, F. J. C.; CARVALHO, C. J. R.; NETO, O. G. Mobilização de RESERVAS NA EMERGÊNCIA DE SEMENTES DE CUPUAÇUZEIRO **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa**, n.12, 1999.

FINK, A.L.; CALCIANO, L.J.; Goto, Y.; Takuzo Kurotsu; Daniel R. Palleros. Classification of Acid Denaturation of Proteins: Intermediates and Unfolded States. **Biochemistry**. v.33, n.41, p. 12504–12511, 1994.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Lactokinins: Whey protein-derived ACE inhibitory peptides. **Nahrung**, v. 43, n.3, p.165-167, 1999.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **British Journal of Nutrition**, v.84, n. 1, p.33-37, 2000.

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

GARCIA, I. P. **Enzimas produzidas durante os diferentes estágios de fermentação das sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)**. 2006. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2006.

GONDIM, T. M. S.; THOMAZINI, M.J.; CAVALCANTE, M. J. B.; SOUZA, J. M.L. Aspectos da produção de Cupuaçu **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa** nº67, 2001.

GUANG, C.; PHILLIPS, R. D. Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Journal Agric. Food Chem**, n. 57, p. 5113-5120. 2009.

GUILLÉN, M. C. G.; GIMÉNEZ, B.; CABALLERO, M. E. L.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**. v. 25 p.1813 – 1827, 2011.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 191-216.

HARTMANN, R., MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion Biotechnology**. v.18, n.2, p.163-169, 2007.

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO DO ESTADO DO AMAPÁ (IDAM). **Produção de cupuaçu no Amapá**. 2015. Disponível <<http://www.idam.am.gov.br/producao-de-cupuacu-no-amazonas/#.VllfzdKrTIU>> acessado em outubro de 2015.

INTARASIRISAWATA, R.; BENJAKUL, S.; WU, J.; VISESSANGUAN, W. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. **Journal of Functional foods**, v. 5, p. 1854 –1862, 2013.

JAKUBCZYK, A.; KARAŚ, M.; BARANIAK, B.; PIETRZAK, M. The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. **Food Chemistry**, v.141, n 4, p. 3774-3780, 2013.

JAKUBCZYK, A.; BARANIAK, B. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Obtained after In Vitro Hydrolysis of Pea (*Pisum sativum* var. Bajka) Globulins. **BioMed Research International**. v. 2014, 2014.

KELKAR, S.; SIDDIQ, M.; HARTE, J. B.; DOLAN, K. D.; NYOMBAIRE, G.; SUNIAGA, H.. Use of low-temperature extrusion for reducing phytohemagglutinin activity (PHA) and oligosaccharides in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. navy and Pinto. **Food Chem** v. 133,p.1636–39, 2012.

KURAMOTO, S.; KANEYOSHI, G.; MORINAGA, Y.; MATSUE, H.; IWAI, KUNIHISA, I. Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides Isolated from Pepsin Hydrolyzate of *Apios americana* Tuber and Their Hypotensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. **Food Sci. Technol. Res.**, v.19, n.3, p.399 – 407, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. **Nature**, London, v. 227, 690-685,1970.

LAPSONGPHON, N.; YONGSAWATDIGUL, J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. **Food Chem**, v.141, n.2, p.992-9, 2013

LEE, K. J.; KIM, S. B.; RYU, J. S.; SHIN, H. S.; LIM, J. W. Separation and Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Goat's Milk Casein Hydrolysates. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** v. 18, n. 5, p. 741-746, 2005.

LI, G.H. ; WAN,J.Z.; LE,G.W. ; SHI, Y.H. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. **Journal of Peptide Science**.n.12, p. 509–514. 2006

LO, W.M.Y; LI-CHAN, C.Y. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from In Vitro Pepsin-Pancreatin Digestion of Soy Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.9, p.3369-3376, 2005.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento.** 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LOPES, A. S.; GARCÍA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das Condições de Torração Após a Fermentação de Amêndoas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e Cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology.** v.6, n.2, p. 309-316, 2003.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.99, n.2, p.755-761, agosto. 2012.

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schum.).** 2001. 164 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos , Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2001.

MEGÍAS, C; YUST, M.D.M; PEDROCHE, J.; LQUARI, H; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Purification of an ACE Inhibitory Peptide after Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.7, p. 1928-1932, 2004.

MEISEL H., WALSH D. J., MURRAY B., FITZGERALD R. J. ACE inhibitory peptides. in: **Nutraceutical proteins and peptides in health and disease.** Mine Y., Shahidi F. (Eds.), CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 269-315. 2006

MELLANDER, O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. Apud : LEPPÄLÄ, A. P. Bioactives peptides derived from bovine whey proteins : opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science and Techonoly.** v. 11, p. 347-356, 2001.

MESSAOUDI, M.; LEFRANC-MILLOT, C.; DESOR D; DEMAGNY B; BOURDON L. Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. **European Journal of Nutrition.** v.44, n.2, p.128-32, 2005

MINKIEWICZ, P.; DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; DZIUBA, M.; DAREWICZ, M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **J AOAC Int.** v. 91, n. 4, p. 965-980, 2008.

MOHANTY, D.P; MOHAPATRA, S; MISRA, S.; SAHU, P.S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences.** v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016.

MOJICA, L.; CHEN, K.; MEJÍA, E.G. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. **Journal of Food Science**. v.80, n.1, p.188-98, 2015.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NASCIMENTO, W. M. O.; GALVÃO, E.U.P.; STEIN, R. L. B.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, J.E.L.F.; CARVALHO, J.E.U.; NUNES, A. M.L.; NAZARÉ, R.F.R. BARBOSA, W. C. **A cultura do cupuaçu**. Brasília: EMBRAPA. 1995. 61p.

NAZARÉ, R. F. R.; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R. M. F. Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção do cupulate. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1990.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NEVES, R. M. **Utilização de hidrolisados enzimáticos de peixes para obtenção de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA)**. 2005. 93f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

NOBRE, F.; CHACHAR, F.; VIANA, J. M.; PEREIRA, G. J. V.; LIMA, N. K. C. Avaliação do Atendimento do Hipertenso em Serviço de Urgência e em Ambulatório de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 2, p. 159-61, 2002.

NOGATA Y., NAGAMINE T., YANAKA M., OHTA H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides produced by autolysis reactions from wheat bran. **J. Agric. Food Chem**. v. 57, p. 6618-6622, 2009.

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

POWNALL, T. L.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n.8, p.4712- 4718, 2010.

QU, W.; MA, H.; JIA, J.; HE, R.; LUO, L.; PAN, Z. Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing. **Ultrasonics Sonochemistry** v. 19, p. 1021–1026, 2012.

QUAST, L. B.; LUCCAS, V.; ROTH, T. C. W.; KIECKBUSCH, T. G. Influência da incorporação de gordura de cupuaçu na temperagem da manteiga de cacau. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, n. 2, p. 130-136, 2007.

QUIST, E. E.; PHILLIPS, R. D.; SAALIA, F.K. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of proteolytic digests of peanut (*Arachis hypogaea* L.) flour. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n. 3, p. 694-699, 2009.

REISDORFF, C.; ROHSIUS, C.; SOUZA, A. das G. C. de; GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R. Comparative study on the proteolytic activities and storage globulins in seeds of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum and *Theobroma bicolor* Humb Bonpl, in relation to their potential to generate chocolate-like aroma. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 84, n. 7, p. 693-700, 2004.

RIBEIRO, G. D. ; COSTA, R, S. C. C.; FERREIRA, M. G. R.; NASCENTE, A. S.; NUNES, A. M. L.; TEIXEIRA, C. A. D.; BENTES-GAMA, M. M. Cultivo do Cupuaçu em Rondônia. **Sistemas de Produção**, 9. ISSN 1807-1805 Versão Eletrônica Dez./2005

RIORDAN, J.F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. **Genome Biol.** v. 4, n.8, p. 225, 2003.

ROGERS, A., GIBON, Y. Enzyme kinetics: theory & practice. In: Schwender J, editor. Plant metabolic networks. Berlin Heidelberg New York: Springer. p 71–103, 2012.

ROY, F.; BOYE, J.I.; SIMPSON, B.K Bioactives proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**. v. 43, p.432-442, 2010.

RUI, X.; BOYE, J. I.; RIBEREAU, S.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S.O. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. **Food Research International**. v.44, n. 8, p. 2497–2504, 2011

RUTHERFURD-MARWICK, K.J.; MOUGHAN, P.J. Bioactive Peptides Derived from Food. **Journal of AOAC International**, v.88, n.3, p.956-966, 2005.

RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. **Nutrients**, v.3, n.9, p. 765-791, 2011.

SAINT-HILAIRE, Z.; MESSAOUDI, M; DESOR. D.; KOBAYASHI, T. Effects of a Bovine Alpha S1-Casein Tryptic Hydrolysate (CTH) on Sleep Disorder in Japanese General Population. **The Open Sleep Journal**. v. 2,p. 26-32, 2009.

SARMADI, B.; ISMAIL, A.; HAMID, M. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. **Food Research International**, v.44, n.1, p. 290-296, 2011.

SBH/ SBC / SBN. Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Nefrologia. **IV Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial**. Campos do Jordão (Brasil): SBH, SBC e SBN. v.5, n.4, 123- 164, 2002.

SCHWAN, R. F. Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. **Appl Environ Microbiol**. v. 64, n.4, p.1477–1483. 1998.

SECRETARIA DE ESTADO DE DESENVOLVIMENTO DA AGROPECUARIA E DA PESCA (SEDAP). Disponível < <http://www.sagri.pa.gov.br/pagina/agricultura> > acessado em outubro de 2015.

SILVA, W. G. **Gordura de cupuacu sucedaneo de manteiga de cacau**. 1988. 124p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 1988.

SKELLERN, G. G. Recent advances in pharmaceutical chemistry angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 14, p. 341-354, 1989.

SOUZA, A. G. C.; SOUZA, M. G.; PAMPLONA, A.M.S.R.; WOLFF, A.C.S. Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 8p. (**Circular técnica**, 36), 2011.

STANCIUC N, HINTOU A, STANCIU S, RAPEANU G. Thermal treatment can modify the susceptibility of whey protein concentrate to enzymatic hydrolysis. **Innov Rom Food Biotechnol**. v. 7, n. 8, p. 30–6, 2010.

SUETSUNA, K.; CHEN, J. R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. **Marine Biotechnol**. v. 3, p. 305-309, 2011.

SUETSUNA, K.; NAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). **J Nutr Biochem**. v 11, p. 450-454, 2000.

UCO, J.T.; GUERRERO, L.C.; AYALA, A.M.; ORTÍZ, G.D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, n.10, p. 1597-1604, 2009.

UZZAN, A. Vegetable protein products from seeds: technology and uses in food industry. IN: HUDSON, B. J. F. (Ed). **Development in food proteins**. New York: Elsevier Applied Science, p.73-118, 1998.

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

VOIGT, J.; BIEHL, B.; WAZIR, S. K. S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**. v. 47, p. 145-151, 1993.

VOIGT, J.; BIEHL, B. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**. v. 47, n. 2. p. 145–151, 1993.

WHITE, J. A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

YU, Y.; HU, J.; MIYAGUCHI Y.; BAI, X.; DU Y.; LIN, B.; Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. **Peptides**. v. 27, n. 11, p. 2950-2956, 2006.

ZAMBROWICZ, A.; TIMMER, M.; ECKERT, E. TRZISKA. Evaluation of the ACE-Inhibitory Activity of Egg-White Proteins Degraded with Pepsin. Pol. **J. Food Nutr. Sci.**, v. 63, n. 2, p. 103-108, 2013.

ZHANG, Y.; OLSEN, K.; GROSSI, A.; OTTE, J. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. **Food Chemistry**. v. 141, n. 3, p. 2343-2354, 2013.

ANEXOS

ANEXO 1 – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 2 - Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo de Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 9203041/1 - Sabrina Grizzi de Oliveira

Email: sabrinagrizzi@usp.br
Data de Nascimento: 03/07/1987
Cédula de Identidade: RG - 43.121.547-9 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Centro Universitário FIEO - Fundação Instituto de Ensino para Osasco - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 07/11/2014
Início da Contagem de Prazo: 07/11/2014
Data Limite para o Depósito: 04/09/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 07/11/2014 até o presente. Email: jronasci@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/11/2014
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 07/05/2017 até 04/09/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/12/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/11/2014
 Prorrogação em 03/04/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 03/09/2017 18:07:01

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 9203041/1 - Sabrina Grizzi de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5706-2/2	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos	26/02/2015	21/06/2015	60	4	100	B	N	Concluída
FBA5899-2/4	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	02/03/2015	12/04/2015	90	6	100	A	N	Concluída
BIO5788-3/1	Inglês em Ciência (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	04/03/2015	16/06/2015	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5752-1/3	Probióticos em Alimentos e Suas Implicações na Saúde Humana	05/04/2016	16/05/2016	60	4	100	A	N	Concluída
TNA5801-1/8	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	30/05/2016	10/07/2016	120	8	100	A	N	Concluída
TNM5791-3/2	Metodologia da Pesquisa Científica (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	31/05/2016	22/08/2016	60	4	92	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 03/09/2017 22:38:27