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

**Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de
peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I**

Juliana Nunes da Cruz

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo
2014

JULIANA NUNES DA CRUZ

Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos
inibidores da enzima conversora da angiotensina I

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

Área de Concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. João Roberto
Oliveira do Nascimento

São Paulo
2014

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

Cruz, Juliana Nunes da
C957h Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de
peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina /
Juliana Nunes da Cruz. -- São Paulo, 2014.
104p.

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

Orientador : Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Bioquímica dos alimentos 2. Cupuaçu I. T. II. Nascimento,
João Roberto Oliveira do, orientador.

641.1

CDD

Juliana Nunes da Cruz

Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos
inibidores da enzima conversora da angiotensina I

Versão original

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Membros Titulares

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

Prof.^a Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez

Prof.^a Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Prof.^a Dra. Vanessa Moreira

Membros Suplentes

Prof.^a Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo, 05 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor incondicional e por me inspirarem todos os dias a ser um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade pelo equilíbrio, força e proteção;

Ao meu orientador João Roberto Oliveira do Nascimento pela oportunidade de realizar esse projeto, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo apoio dado durante esse período e, sobretudo, pela preocupação com a minha formação;

À Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi que desde o Mestrado acreditou na minha capacidade e me abriu as portas, possibilitando meu crescimento como pesquisadora;

Ao pesquisador Dr. Raimundo Mororó e a Fazenda Riachuelo que, gentilmente, me doaram as sementes frescas de cupuaçu.

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán do Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela realização das análises de composição de aminoácidos;

Ao pesquisador Dr. Robson L. de Melo do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan pela colaboração e que, gentilmente, me forneceu o substrato fluorogênico para medição da atividade inibitória da ECA;

Ao pesquisador Dr. Daniel Carvalho Pimenta do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela colaboração nas etapas de fracionamento, sequenciamento e na interpretação dos dados. Enfatizo a minha gratidão pela atenção, disponibilidade de tempo e por dividir comigo tanto conhecimento na área de peptídeos bioativos;

Aos demais professores do Laboratório de Bioquímica, Química e Biologia Molecular do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) que, de alguma forma, contribuíram para minha formação: ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, Profa. Dra. Neuza Hassimoto e ao Prof. Dr. João Paulo Fabi. Obrigada por compartilharem comigo tanto conhecimento;

Às técnicas Lúcia Justino Silva e Dra. Tania Shiga e ao técnico Elias Araujo;

À técnica Márcia Moraes pela companhia em todas as manhãs, pela preocupação comigo, pela ajuda e pela amizade tão sincera;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização do projeto;

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

Aos amigos de laboratório pela companhia e por compartilharem comigo os desafios e as conquistas do dia-a-dia. Em especial a Renata, a Geovana, a Fernanda, ao Victor, a Ana, a Talita, ao Afonso e a Manuela que estiveram sempre ao meu lado e torceram por mim;

À Dra. Amanda Assega que, carinhosamente, me apresentou ao pesquisador Dr. Robson L. de Melo do Instituto Butantan.

A todos os funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) por sempre estarem disponíveis a ajudar;

A minha família, em especial aos meus pais Mário e Cecília, a minha irmã Daniela e ao meu cunhado George, que sempre apoiaram meus estudos e estiveram comigo em todos os momentos da minha formação;

Ao meu avô Sylvio e a minha avó de coração Sylvina que sempre torceram por mim, incentivaram meus estudos e se alegravam a cada conquista;

Ao meu namorado Carlos, que me apoiou e me acompanhou pacientemente nesses últimos anos com muito carinho;

A todos, muito obrigada!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

RESUMO

CRUZ, J.N. **Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I.** 2014. 104p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Peptídeos com ação inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA) podem ser obtidos a partir de diversos alimentos e exercer efeito anti-hipertensivo. O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.), fruto nativo da Amazônia, possui sementes comestíveis contendo proteína de reserva similar à do cacau (*Theobroma cacao* L.), as quais parecem ser fonte de peptídeos inibidores da ECA. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* a ocorrência de peptídeos inibidores da ECA no hidrolisado proteico da semente de cupuaçu obtido por ação da Alcalase. O hidrolisado revelou o desaparecimento de proteínas entre 27 a 180 kDa, incluindo as globulinas, e o surgimento daquelas abaixo de 15 kDa após 2 h de hidrólise, indicando a formação de peptídeos menores. O ensaio de atividade utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH revelou que o hidrolisado total promoveu 65% de inibição da ECA e esse *pool* peptídico foi fracionado em cinco frações (F1-F5) por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC). Após a etapa de purificação, o monitoramento da inibição apontou, ao final, duas frações (3.2.8 e 3.4.10) com maior atividade inibitória. Oito peptídeos foram identificados por LC-MS/MS, sendo três deles já conhecidos como inibidores da ECA. Outros cinco novos peptídeos identificados (FLEK, GSGKHVSP, LDNK, MVVDKLF e MEKHS) foram sintetizados e tiveram sua ação inibitória validada por ensaios *in vitro*. O peptídeo GSGKHVSP apresentou a menor IC_{50} (3,11 μ M) e K_i (0,74 μ M), sendo um inibidor tipo misto quanto ao seu mecanismo de inibição revelado pelo gráfico de Lineweaver-Burk. Os resultados permitem concluir que o isolado proteico da semente de cupuaçu pode ser uma fonte para obtenção de peptídeos anti-hipertensivos, a despeito de serem necessárias investigações sobre a resistência desses peptídeos à digestão gastrointestinal e a eficácia da inibição *in vivo*.

Palavras-chave: peptídeos bioativos, atividade inibitória da ECA, hidrolisado proteico, semente de cupuaçu.

ABSTRACT

CRUZ, J.N. **Hydrolyzed cupuassu seed protein as a source of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides**. 2014. 104p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity may be obtained from several foods and cause antihypertensive effect. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* S.), a native fruit from Amazon, has edible seeds with a storage protein similar to that of cocoa (*Theobroma cacao* L.) which seems to have incrypted ACE inhibitor peptides. Thus, the aim of this project was to investigate the *in vitro* formation of ACE inhibitory peptides in protein hydrolysate from cupuassu seeds using Alcalase enzyme. The hydrolysate revealed the disappearance of proteins between 27 and 181 kDa after 2h hydrolysis, including the globulin, and the increase of those below 15 kDa, indicating the formation of peptides. The ACE inhibitory activity assays using the substrate Abz-FRK(Dnp)P-OH revealed the hydrolysate had 65% ACE inhibition and the pool of peptides was fractionated into five fractions (F1-F5) by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). After the purification step, two fractions (3.2.8 e 3.4.10) exhibited the highest ACE-inhibitory activity. Eight peptides had been identified by LC-MS/MS and three of them were ACE inhibitors. The other newly identified peptides (FLEK, GSGKHVSP, LDNK, MVVDKLF and MEKHS) were synthesized and *in vitro* assayed for ACE inhibitory activity. The peptide GSGKHVSP had the lower IC₅₀ (3.11 µM) and K_i (0.74 µM). Lineweaver-Burk plots suggest this peptide is a mixed-type inhibitor according to the inhibition mechanism. The results indicate that protein isolate from cupuassu seeds may be a good protein source of antihypertensive peptides and further investigation is needed in order to evaluate the resistance of these peptides to gastrointestinal digestion and the inhibitory activity *in vivo*.

Keywords: bioactive peptides, ACE-inibitory activity, protein hydrolysate, cupuassu seed.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema do sistema Renina-Angiotensina e do sistema Calicreína-Cinina, indicando a atuação da enzima conversora da angiotensina I (ECA).....03
- Figura 2** - Fluxograma das etapas envolvidas no estudo de peptídeos bioativos, desde a obtenção, estratégias de purificação até a caracterização estrutural dos peptídeos. O asterisco indica que em cada etapa é necessário realizar um *screening in vitro* da atividade avaliada09
- Figura 3** - Quantidade de cupuaçu produzido (toneladas) no período entre 2003 a 2012 no estado do Pará19
- Figura 4** – Etapas de processo do aproveitamento das sementes de cupuaçu: semente fresca (*in natura*), ainda com resíduos de polpa aderida (A), fermentada e seca (B) e torrada (C)21
- Figura 5** – Sementes frescas (*in natura*) de cupuaçu ainda com resíduos de polpa aderida.....25
- Figura 6** - Evolução do grau de hidrólise do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu pela ação da Alcalase em função do tempo de hidrólise. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis ensaios (n=16). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p < 0,05$)47
- Figura 7** – 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) farinha seca e desengordurada da semente fresca de cupuaçu; (3) isolado proteico obtido da semente fresca de cupuaçu; (4) hidrolisado obtido pela ação da Alcalase em 2h de ensaio; (5) hidrolisado obtido pela ação da Alcalase em 4h de ensaio; (6) hidrolisado obtido pela ação da Alcalase em 8h de ensaio. Foram aplicadas 20 μ g de proteína por poço para todas as amostras. Foram utilizados 5 μ L do padrão de massa molecular. À direita estão indicadas as posições aproximadas da banda da globulina e albumina.....49
- Figura 8** – Cromatograma de eluição do substrato (HHL) e do produto (HA) após reação enzimática nas condições cromatográficas estabelecidas com tempos de retenção de 9,1 e 7,9 min, respectivamente51
- Figura 9** - Curva padrão de ácido hipúrico (HA) determinada a partir da relação entre diferentes valores de massa de HA (expresso em μ g) com as suas respectivas áreas de picos detectados nos cromatogramas.....52
- Figura 10** - Produção de ácido hipúrico (HA) a partir da reação da enzima conversora da angiotensina (1mU) com Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) em função do tempo de incubação53
- Figura 11** – Cromatograma de eluição do pico detectado com tempo de retenção 7,9 min referente ao hidrolisado obtido em 1 h de hidrólise a partir do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu54
- Figura 12** – Cromatograma de eluição dos picos detectados com tempos de retenção 7,9 min referentes ao hidrolisado obtido em 1 h de hidrólise a partir do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu antes e após adição de solução padrão de ácido hipúrico (HA)55

Figura 13 - Perfil da formação de ácido hipúrico (HA) em função do aumento da quantidade de enzima conversora da angiotensina expressa em mU. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....56

Figura 14 - Perfil de inibição da ECA, expressa em porcentagem, em função do tempo de hidrólise 0, 2, 4 e 8 h do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu pela ação da Alcalase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de um ensaio experimental (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p < 0,05$).....57

Figura 15 – Efeito inibitório de diferentes diluições dos hidrolisados obtidos em 2, 4 e 8 h sobre a ECA (%). Os pontos representam a inibição da ECA nos diferentes tempos de hidrólise (%) e as barras representam a diferença de inibição da ECA entre 2 e 8 h (%). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de dois ensaios experimentais (n=4).....58

Figura 16 - Emissão de fluorescência, medida em unidades arbitrárias de fluorescência por min (AFU.min⁻¹), a partir da reação da enzima conversora da angiotensina (0,5mU) com diferentes concentrações do substrato fluorogênico Abz-FRK(Dnp)-P-OH após 10 min de reação.....59

Figura 17 - Perfil de inibição da ECA (expressa em %) pelo método de fluorescência, em função dos tempos de hidrólise 0, 2, 4 e 8h do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu pela ação da Alcalase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três ensaios experimentais (n=9). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p < 0,05$)60

Figura 18 - Perfil cromatográfico do hidrolisado proteico da semente de cupuaçu por RP-HPLC, utilizando coluna C₁₈ (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Para eluição, foi utilizado gradiente entre 10 a 60% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA com taxa de fluxo de 1 ml.min⁻¹ e detecção de absorbância em 214 nm. A coleta das frações foi realizada a cada 5 min, exceto para a primeira fração, totalizando cinco frações (F1-F5).....63

Figura 19 – Perfil da atividade inibitória da ECA (%) das cinco frações coletadas (F1-F5) na primeira etapa de fracionamento por RP-HPLC, utilizando no ensaio diferentes volumes de cada fração. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3)64

Figura 20 - Perfil cromatográfico do fracionamento da F3 por RP-HPLC, utilizando coluna C₁₈ (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m). A fração foi eluída de forma isocrática com 16% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA com taxa de fluxo de 1,4 ml.min⁻¹ e detecção de absorbância em 214 nm. A coleta das frações foi realizada a cada 2,5 min, exceto para a primeira e última fração, totalizando sete subfrações (F3.1-F3.7)65

Figura 21 - Perfil cromatográfico da etapa de purificação da subfração 3.2 (A) e da subfração 3.4 (B) por RP-HPLC, utilizando coluna C₁₈ com base de carbono (Hypercarb, Thermo Scientific) (150 x 4,6 mm), em eluição isocrática de 16% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA com taxa de fluxo de 1 ml.min⁻¹ e detecção de absorbância em 214 nm. Os números sobre os picos identificam aqueles que foram testados a atividade inibitória da ECA. Oito picos foram selecionados da subfração 3.2 e dez picos foram selecionados da subfração 3.4. A seta indica o pico que apresentou maior efeito inibidor da ECA em cada uma das separações.....67

Figura 22 – Sequenciamento peptídico do pico 3.2.8 por LC-MS/MS. (A) perfil cromatográfico de separação por RP-HPLC monitorada a 214 nm; (B) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 2,4 min; (C) Zoom do principal íon, mostrando a distribuição isotópica e o estado de cargas (+1); (D) Espectro de fragmentação (MS²) do íon m/z 322.17; (E) Espectro MS² processado e interpretado do sequenciamento *de novo*.....71

Figura 23 – Dedução da sequência do peptídeo FLEK com duas cargas presente do pico 3.4.10 por LC-MS/MS. (A) Zoom do espectro do tempo de retenção de 9,8 min; (B) Espectro de fragmentação (MS^2) do íon m/z 268.6; (C) Espectro MS^2 processado e interpretado; (D) Atribuição dos íons (a partir da sequência deduzida) ao espectro real; (E) Distribuição dos erros dos íons filhos72

Figura 24 – Determinação da IC_{50} dos peptídeos inibidores da ECA. As curvas semilogarítmicas para a determinação da IC_{50} relativo à inibição da ECA foram construídas a partir de diferentes concentrações (expressas em μM) dos seguintes peptídeos sintéticos: LDNK (A), FLEK (B), MEHKS (C), MVVDKLF (D) e GSGKHVSP (E)77

Figura 25 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (--○--) e na presença do peptídeo inibidor MVVDKLF nas concentrações de 112 μM (--●--) e 167 μM (--□--). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática80

Figura 26 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (--○--) e na presença do peptídeo inibidor LDNK nas concentrações de 183 μM (--●--) e 273 μM (--□--). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática80

Figura 27 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (--○--) e na presença do peptídeo inibidor FLEK nas concentrações de 18 μM (--●--), 90 μM (--□--). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática82

Figura 28 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (--○--) e na presença do peptídeo inibidor MEKHS nas concentrações de 80 μM (--●--) e 160 μM (--□--). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática82

Figura 29 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (--○--) e na presença do peptídeo inibidor GSGKHVSP nas concentrações de 1,34 μM (--●--), 4 μM (--□--) e 10 μM (--■--). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da semente fresca de cupuaçu expresso em porcentagem (base seca)	41
Tabela 2 - Composição de aminoácidos do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu	45
Tabela 3 – Efeito da diluição sobre a atividade inibitória da ECA do hidrolisado proteico total (não-fracionado).....	62
Tabela 4 – Atividade inibitória da ECA (%) das sete subfrações coletadas do fracionamento de F3 por RP-HPLC	66
Tabela 5 – Atividade inibitória da ECA (%) dos oito picos coletados na etapa de purificação da subfração 3.2 por RP-HPLC.	68
Tabela 6 – Atividade inibitória da ECA (%) dos dez picos coletados na etapa de purificação da subfração 3.4 por RP-HPLC.....	69
Tabela 7 - Atividade inibitória da ECA das etapas de separação da fração 3	70
Tabela 8 – Sequência de aminoácidos e respectivas massas moleculares dos peptídeos encontrados nos picos 3.2.8 e 3.4.10	73
Tabela 9 – Peptídeos identificados no pico 3.4.10 do hidrolisado proteico da semente de cupuaçu e sequências peptídicas já identificadas com atividade inibitória da ECA disponíveis no BIOPEP*	75
Tabela 10 – Valores de IC_{50} e da constante de inibição (K_i) dos peptídeos sintéticos selecionados como potenciais inibidores da ECA.....	78
Tabela 11 – Previsão de fragmentos resultantes da ação de enzimas digestivas sob os peptídeos inibidores da ECA, usando a ferramenta “ação da enzima” disponível no BIOPEP*	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz-FRK(Dnp)-P-OH	Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AU	Unidades Anson
DH	Grau de hidrólise
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima conversora da angiotensina
HA	Ácido hipúrico
Hg	Mercúrio
HHL	Hipuril-Histidil-Leucina
HL	Histidil-Leucina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC ₅₀	Concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade da ECA
kDa	Kilo Daltons
LC/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas
mAU.S	mili unidade de Absorbância por segundo
MS	Espectrometria de massas
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHR	Ratos espontaneamente hipertensivos
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TFA	Ácido trifluoroacético
U	Unidades de enzima
UAF.min ⁻¹	Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto
UV	Ultravioleta

LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	Hist	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
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	03
1.2 CARACTERÍSTICAS DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA	05
1.3 ETAPAS ENVOLVIDAS NO ESTUDO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS	
<i>IN VITRO</i>	08
1.3.1 Obtenção de peptídeos inibidores da ECA por hidrólise enzimática	11
1.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibitória da ECA	14
1.3.3 Técnicas de fracionamento e purificação dos peptídeos bioativos	15
1.4 SEMENTES COMESTÍVEIS COMO FONTES PROTEICAS	
ALTERNATIVAS	17
1.4.1 A semente de cupuaçu como fonte de peptídeos bioativos	18
1.5 JUSTIFICATIVA	22
2. OBJETIVO	24
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 MATERIAL	25
3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	25
3.2.1 Determinação do teor de umidade	25
3.2.2 Determinação dos lipídeos	26
3.2.3 Determinação do teor de proteínas	26
3.2.4 Determinação do teor de cinzas	26
3.2.5 Determinação de carboidratos	26
3.2.6 Determinação do teor de fibras	27
3.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO	27
3.3.1 Preparação da amostra	28
3.3.2 Obtenção do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu	28
3.3.3 Determinação da composição de aminoácidos	29

3.3.4 Obtenção do hidrolisado a partir do isolado da semente fresca de cupuaçu.....	29
3.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE (DH)	30
3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	31
3.6 ULTRAFILTRAÇÃO DOS HIDROLISADOS POR EXCLUSÃO MOLECULAR	32
3.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA.....	33
3.7.1 Preparação da enzima conversora da angiotensina I	33
3.7.2 Determinação da inibição da ECA com o substrato HHL.....	33
3.7.3 Determinação da inibição da ECA com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH	34
3.8 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO EM RP-HPLC.....	35
3.9 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	36
3.10 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	37
3.11 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ E DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K _i).....	37
3.12 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES SINTETIZADOS	39
3.13 ESTABILIDADE DOS PEPTÍDEOS PELA AÇÃO DA ECA	40
3.14 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	41
4.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DA SEMENTE FRESCA DE CUPUAÇU.....	43
4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS	44
4.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE	47
4.5 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE DE CUPUAÇU E DOS HIDROLISADOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA ALCALASE	48
4.6 ENSAIO DE DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ECA COM O SUBSTRATO HHL	51
4.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA UTILIZANDO O SUBSTRATO HHL	56
4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA UTILIZANDO O SUBSTRATO	

ABZ-FRK(Dnp)-P-OH.....	59
4.9 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA.....	62
4.10 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA.....	70
4.11 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ E DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K _i).....	76
4.12 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS	79
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXOS	102

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, é crescente a busca de novas fontes de alimentos que, além da relevância de seus nutrientes, apresentem eventuais componentes capazes de trazer benefícios à saúde humana, diminuindo o risco de doenças crônicas. Esses compostos bioativos são definidos como constituintes nutricionais ou não nutricionais presentes em baixas concentrações em determinados alimentos e que promovem efeitos positivos na saúde (BIESALSKI et al., 2009). Como esses compostos, em sua maioria, são produtos derivados do metabolismo secundário das plantas, são encontrados, principalmente, em frutas, leguminosas, sementes e grãos. Inúmeros compostos bioativos são conhecidos e já foram caracterizados de acordo com sua estrutura química e também com relação à função biológica. Estudos epidemiológicos indicam a associação da ingestão desses compostos com efeitos cardioprotetores, antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos, entre outros (KRIS-ETHERTON et al., 2002; PATIL et al., 2009; THILAKARATHNA et al., 2012).

O avanço das pesquisas na identificação de novos compostos bioativos impulsionou, nos últimos anos, a sua utilização como alimentos ou ingredientes funcionais, representando uma das áreas de maior interesse e investimento na indústria de alimentos. Sendo assim, a identificação de novos compostos em diferentes fontes de alimentos que sejam capazes de melhorar o estado de saúde e reduzir o risco de doenças tornou-se uma estratégia com boas perspectivas para o desenvolvimento de alimentos capazes de enriquecer a dieta humana.

Nesse contexto, estudos recentes têm demonstrado que diversas proteínas alimentares, além da sua função básica nutricional, podem ser fontes de peptídeos capazes de exercer atividades biológicas específicas quando liberados de sua sequência original (WILSON et al., 2011; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2010; MURRAY et al., 2007). Esses peptídeos bioativos tem sido amplamente estudados e considerados como positivos para a saúde humana, uma vez que podem promover efeitos benéficos no sistema imune, cardiovascular e gastrointestinal (HARTMANN e MEISEL, 2007). Devido a esses efeitos positivos, houve um aumento das pesquisas voltadas para a descoberta de novos peptídeos bioativos a partir de diferentes fontes proteicas, os quais podem ser utilizados como ingredientes em alimentos funcionais (ERDMANN et al., 2008; HARTMANN e MEISEL, 2007). De acordo com a ANVISA

(Resolução nº18/99), alimentos ou ingredientes com propriedades funcionais são aqueles que, além de ter funções nutricionais básicas, podem promover efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, sendo cientificamente comprovados e devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Nesse sentido, as alegações podem fazer referências à manutenção da saúde e à redução do risco de doenças.

Os peptídeos bioativos são definidos como sequências de aminoácidos que se encontram nas proteínas nativas e podem exercer funções biológicas quando liberados por um processo de hidrólise *in vivo* ou *in vitro* (HARTMANN e MEISEL, 2007). Potentes peptídeos bioativos podem ser derivados de proteínas alimentares a partir da proteólise enzimática durante a digestão gastrointestinal ou em razão do processamento enzimático industrial (ERDMANN et al., 2008).

Muitos peptídeos possuem atividade biológica comprovada, podendo ser obtidos a partir das proteínas do leite, da carne, de organismos marinhos e até mesmo de sementes e grãos (HARTMANN e MEISEL, 2007). Dependendo da sequência de aminoácidos, alguns peptídeos bioativos podem apresentar propriedades antimicrobianas (BENKERROUM 2010; KIM e WIJESEKARA, 2010), promover redução na pressão arterial (KIM e WIJESEKARA, 2010; KODERA e NILO, 2006) ou no colesterol plasmático (WERGEDAHL, 2004), apresentar atividade antioxidante (KIM e WIJESEKARA, 2010), além de poderem atuar como imunomoduladores, dentre outros efeitos benéficos. Muitos desses peptídeos bioativos podem exercer mais do que um dos efeitos mencionados, portanto, podem apresentar mais de uma atividade biológica.

Entre esses peptídeos com atividade biológica relevante, destacam-se os peptídeos com ação inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA), a qual atua no sistema renina-angiotensina responsável pela pressão sanguínea. A inibição dessa enzima exerce um efeito anti-hipertensivo e diversos estudos evidenciam peptídeos com essa atividade biológica sendo obtidos a partir de diversas fontes proteicas.

Detalhes específicos sobre o sistema Renina-Angiotensina e a importância da atuação da enzima conversora da angiotensina I (ECA) nesse sistema são descritos a seguir, assim como, os mecanismos de atuação de peptídeos bioativos com atividade inibitória sobre a ECA.

1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Entre os vários sistemas bioquímicos inter-relacionados responsáveis pela regulação cardiovascular, um dos mais importantes é o sistema renina-angiotensina. Esse sistema é considerado como um dos principais reguladores da pressão arterial que consiste numa cascata de reações bioquímicas iniciada pela liberação da renina (**Figura 1**).

Figura 1 - Esquema do sistema Renina-Angiotensina e do sistema Calicreína-Cinina, indicando a atuação da enzima conversora da angiotensina I (ECA). Adaptado de Li et al. (2004).

A renina é uma enzima proteolítica, composta por aproximadamente 350 aminoácidos, sintetizada e armazenada sob a forma inativa, pró-renina, nas células justaglomerulares localizada nos rins (NEVES et al., 2006).

De uma maneira geral, quando a pressão arterial diminui, a renina é liberada e ativada na corrente sanguínea e atua na clivagem do seu substrato, o angiotensinogênio. O angiotensinogênio é um glicopeptídeo com massa molecular de aproximadamente 60kDa, produzido em vários tecidos, como no adiposo, fígado, cérebro e outros órgãos. Quando clivado na sua porção *N*-terminal, resulta na liberação do decapeptídeo (Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro-Fe-His-Leu) angiotensina I. Logo após essa formação, ocorre a liberação do octapeptídeo angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro-Fe) em resposta à clivagem do dipeptídeo C-terminal (His-Leu) da angiotensina I. Além de aumentar a resistência periférica, sendo um potente vasoconstritor, a angiotensina II estimula a síntese de aldosterona pelo córtex suprarenal, o qual diminui a excreção de sal e água pelos rins, promovendo o aumento da pressão arterial (CRISAN e CARR, 2000; LI et al., 2004). Esta reação é catalisada pela ECA, presente em diversos órgãos, mas principalmente nos pulmões (ERDOS, 1976; LI et al, 2004). A ECA é uma dipeptidilcarboxipeptidase, também classificada como zinco metalopeptidase, sendo dependente do íon cloreto para sua ativação. É responsável pela clivagem de cadeias polipeptídicas liberando unidades dipeptídicas a partir da extremidade C-terminal (CARMONA et al., 2009; GUANG et al, 2012).

A ECA também é responsável por catalisar a degradação de um vasodilatador, a bradicinina, um nonapeptídeo com ação hipotensora no sistema calicreína-cinina (CHEUNG et al., 1980).

A ECA é expressa em duas isoformas: germinal, expressa somente nas células dos testículos (tECA, 90-110 kDa), com apenas um domínio (domínio-C) e um único sítio catalítico; e a isoforma somática (sECA, 150-180 kDa), expressa na maioria dos tecidos (em células epiteliais, endoteliais e neuroepiteliais) e no plasma com dois domínios homólogos, classificados como N e C, cada um com um sítio catalítico e propriedades bioquímicas distintas (PAN et al., 2011; TZAKOS et al., 2003; CORRADI et al., 2006). A atividade do domínio-C depende da concentração do íon cloreto, enquanto o domínio-N pode ser ativo na ausência desse íon (GUANG et al., 2012). Os dois domínios participam na hidrólise dos substratos angiotensina I e bradicinina. Nesse contexto, inibidores da ECA podem atuar em ambos os domínios, mas estudos apontam que o domínio-C promove maior eficiência catalítica na conversão da angiotensina I ao passo que na degradação do substrato bradicinina, ambos os domínios promovem a mesma eficiência catalítica

(BERNSTEIN et al., 2011; FUCHS et al., 2008). Desse modo, inibidores com seletividade para cada domínio da ECA têm sido mais bem investigados para esclarecer a função de cada um na redução da pressão arterial (LUNOW et al., 2015; GEORGIADIS et al., 2003; AKIF et al., 2010).

As drogas sintéticas como o captopril, enalapril, lisinopril são potentes inibidores da ECA, evidenciando a importância dessa enzima no organismo uma vez que, efetivamente, diminuem a pressão arterial em indivíduos com hipertensão, e, consequentemente, diminuem o risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral, melhorando até mesmo o prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca e diabetes (SICA et al., 2008).

Várias proteínas alimentares contêm peptídeos potencialmente capazes de inibir a ECA e têm sido isoladas de fontes diversas, incluindo, em sua grande maioria, as proteínas do soro de leite (RICI et al., 2010), organismos marinhos (KIM e WIJESEKARA 2010) e a soja (KODERA et al., 2006). Proteínas contendo peptídeos com potencial inibição da ECA também ocorrem em outros alimentos menos estudados, mas que constituem fontes alternativas potenciais, como, por exemplo, a ervilha (ROY et al., 2010), o grão de bico (YUST et al., 2003; ROY et al., 2010), a lentilha (ROY et al., 2010) e outras sementes comestíveis com alto valor protéico, como o amendoim (JAMDAR et al., 2010; QUIST et al., 2009) e o amaranto (TIENGO et al., 2009; SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008). Essas matrizes proteicas alternativas têm sido estudadas como fontes de peptídeos bioativos com base em duas principais justificativas: o reaproveitamento de resíduos gerados pela indústria de alimentos, com o objetivo de adicionar mais valor agregado a esses subprodutos, como por exemplo, o soro do leite; e a seleção de proteínas que apresentam sequências específicas para uma determinada atividade biológica de interesse. (UDENIGWE e ALUKO, 2012).

1.2 CARACTERÍSTICAS DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA

Diversos estudos na literatura relatam que a maioria dos peptídeos inibidores da ECA apresentam algumas características em comum, o que evidencia uma relação estrutura-atividade (GUANG e PHILLIPS, 2009; ERDMANN et al., 2008; HONG et al., 2008), ou seja, a atividade biológica inibitória está relacionada com características estruturais desses peptídeos. Além disso, esses inibidores, em sua

maioria, atuam como substratos competitivos da ECA, os quais se ligam ao sítio ativo da enzima, impedindo a complexação com o seu substrato angiotensina I (GUANG e PHILLIPS, 2009).

Peptídeos com atividade de inibição sobre a ECA, comumente, apresentam sequências curtas contendo de dois a doze aminoácidos (MATSUI e MATSUMOTO, 2006), uma vez que a estrutura do sítio catalítico da ECA não acomoda peptídeos maiores, de acordo com Hernández-Ledesma et al. (2011). Além disso, essa atividade inibitória pode ser modulada de acordo com a massa molecular desses peptídeos. Pan et al. (2012), por exemplo, obtiveram o hidrolisado da proteína do soro do leite e avaliaram a atividade de inibição da ECA quando filtrado em membranas de exclusão molecular de <6, 6-10 e >10 kDa. Os resultados indicaram que a atividade inibitória da ECA aumentou à medida que a massa molecular das frações hidrolisadas diminuiu. Cheung et al. (2009) avaliaram a atividade inibitória da ECA no isolado proteico de aveia e também observaram que os hidrolisados fracionados em membranas de exclusão molecular <0,5, 0,5-1, >1 kDa apresentaram a maior atividade de inibição em sua menor massa molecular (<0,5 kDa), sugerindo que sequências peptídicas menores apresentam maior atividade biológica.

Estudos evidenciam a preferência da ECA por substratos que contenham resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada) no tripeptídeo C-terminal (CHEUNG et al., 1980). De acordo com Li et al. (2004), a relação estrutura-atividade dos diferentes peptídeos inibidores da ECA indica que a ligação dessa enzima é fortemente influenciada pela sequência do tripeptídeo C-terminal do substrato e/ou do inibidor, uma vez que interagem com os subsítios S1, S1' e S2' do sítio ativo da enzima e, também, podem interagir diretamente com o íon catalítico (Zn^{2+}) (PAN et al., 2011; Ni et al., 2012). Portanto, a ação dos peptídeos inibidores é fortemente influenciada pela sequência dos aminoácidos que constituem esses fragmentos.

A presença de aminoácidos como fenilalanina, prolina, triptofano e tirosina nas três últimas posições C-terminal confere a esses peptídeos maior atividade de inibição (LI et al., 2004; MATSUI et al., 2006). Mais especificamente, a presença de aminoácidos aromáticos como Pro, Ala, Val e Leu são mais favoráveis para ligação ao antepenúltimo subsítio (S1), enquanto Ile é mais favorável ao penúltimo subsítio (S1') e Pro e Leu são os aminoácidos mais favoráveis para ligação ao último

subsítio (S2') (ONDETTI e CUSHMAN, 1982 descrito por JAO et al., 2012). Recentemente, Lunow et al. (2015) observaram que aminoácidos alifáticos na posição N-terminal e o triptofano na posição C-terminal em dipeptídeos são estruturas mais favoráveis no potente efeito inibidor do domínio-C da ECA.

A presença desses aminoácidos, revelados pelo sequenciamento peptídico, tem sido demonstrada em diversos estudos, proporcionando uma base mais sólida para a relação estrutura-atividade (JANG et al., 2011; LO et al., 2005). Como exemplo, maior atividade de inibição da ECA foi observada no tripeptídeo DLP obtido da hidrólise proteica da soja (WU e DING, 2002) e no peptídeo RVPSL após hidrólise da proteína do ovo (LIU et al., 2010). Da mesma forma, foi encontrada inibição da ECA em oligopeptídeos como VWDPPKFD, FEDYVPLSCF e FNVPLYE provenientes da hidrólise das proteínas do subproduto do salmão (AHN et al. 2012). Todos esses estudos indicaram a forte influência de aminoácidos hidrofóbicos como a prolina, valina, leucina e fenilalanina no grupo C-terminal dos peptídeos obtidos de diversas fontes proteicas, como relatado anteriormente. Portanto, propriedades composicionais e sequenciais desses peptídeos estão diretamente ligadas a sua capacidade de inibição da ECA.

A ação dos peptídeos inibidores da ECA é dose-dependente e, portanto, depende da sua potência, que é normalmente expressa em IC₅₀ (concentração de peptídeo inibidor necessária para inibição de 50% da atividade da ECA) (ROY et al., 2010). A avaliação da atividade inibitória da ECA, por exemplo, nos peptídeos FFYY e WHP provenientes da hidrólise das proteínas do leite de soja resultou em valores significativamente baixos (1,9 µM e 4,8 µM, respectivamente) de IC₅₀, o que evidencia a potencial atividade biológica desses dois peptídeos identificados nessa fonte proteica (TOMATSU et al., 2013) quando comparados aos peptídeos RIGLF e AHEPVK, identificados da hidrólise das proteínas do cogumelo comestível *Agaricus bisporus*, com valores de IC₅₀ maiores (115,9 e 62,8 µM, respectivamente) (LAU et al., 2014). Valores baixos de IC₅₀ também foram observados nos peptídeos VSV e FL (0,15 µM e 133 µM, respectivamente) das proteínas da canola (WU et al., 2008) e os peptídeos VNP e VWP das proteínas do arroz (6,4 e 4,5 µM, respectivamente) (CHEN et al., 2013), todos identificados após purificação do hidrolisado obtido pela digestão com Alcalase. Esses estudos apontam que a composição de aminoácidos hidrofóbicos em sequências peptídicas curtas responde, de fato, pelo efeito inibidor da ECA, como mencionado anteriormente.

1.3 ETAPAS ENVOLVIDAS NO ESTUDO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS *IN VITRO*

A análise *in vitro* de peptídeos bioativos envolve diversas etapas na obtenção, bem como, diferentes estratégias para alcançar a purificação e identificação desses peptídeos antes de testa-los *in vivo* (**Figura 2**).

De um modo geral, o processo compreende as seguintes etapas básicas: 1ª seleção de uma fonte proteica; 2ª hidrólise pela ação de enzimas industriais, gastrointestinais e/ou até mesmo por processo fermentativo, 3ª *screening in vitro* da potencial atividade de interesse, 4ª fracionamento do *pool* peptídico em sub-frações até a sua purificação; 5ª sequenciamento dos peptídeos com maior atividade e 6ª síntese dos potenciais peptídeos detectados para validar a atividade *in vitro* e, posteriormente também, *in vivo* (PANCHAUD et al., 2014; MAMONE et al., 2009; SAAVEDRA et al., 2013; UDEDIGWE e ALUKO, 2012).

Mais recentemente, análises *in silico* tem sido utilizadas para a pré-avaliação de uma determinada proteína como potencial precursora de peptídeos bioativos com base em dados encontrados da literatura e armazenados em banco de dados *on line*. O banco de dados mais utilizado é o BIOPEP¹ (MINKIEWICZ et al., 2008; DZIUBA et al., 1999), que apresenta em torno de 2600 diferentes sequências de peptídeos classificadas em 27 tipos de atividade biológica de acordo com a estrutura-atividade já estabelecida, sendo as atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas e antioxidantes as mais relatadas (PANCHAUD et al, 2012). Além disso, esse banco de dados possui uma ferramenta denominada “ação da enzima” que permite uma previsão teórica de fragmentos que podem ser gerados a partir da simulação da digestão de uma proteína por ação de enzimas de escolha, objetivando identificar a possível presença de atividade biológica por esses fragmentos. Ou seja, é possível realizar uma simulação da digestão proteica *in silico* para detectar quais fragmentos peptídicos bioativos podem ser gerados de uma sequência proteica conhecida a partir da ação de uma determinada enzima, uma vez que se conhece a sua especificidade (UDENIGWE, 2014). Para esta análise, estão incluídas no banco de dados 29 endopeptidases com especificidade conhecida e é possível realizar a ação proteolítica combinada com até três enzimas distintas.

¹ BIOPEP: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>

Figura 2 - Fluxograma das etapas envolvidas no estudo de peptídeos bioativos, desde a obtenção, estratégias de purificação até a caracterização estrutural dos peptídeos. O asterisco indica que em cada etapa é necessário realizar um *screening in vitro* da atividade avaliada. Adaptado de Udenigwe e Aluko, 2012 e Saavedra et al., 2013.

As enzimas gastrointestinais tem sido as mais utilizadas para esse tipo de análise, uma vez que permite simular o processo de digestão e prever se os peptídeos gerados apresentam uma ou mais atividade biológica, ou ainda, se peptídeos gerados pela ação de outras enzimas e com estruturas bioativas já conhecidas são resistentes à digestão para manter sua atividade. Sendo assim, o objetivo do método *in silico* é reduzir o tempo necessário de ensaios experimentais empíricos na descoberta de novos peptídeos bioativos formados a partir da ação de inúmeras proteases em diversas fontes proteicas (UDENIGWE, 2014).

No caso do amaranto, por exemplo, a análise *in silico* revelou que a globulina 11S apresentou a maior ocorrência de peptídeos anti-hipertensivos quando comparada a outras proteínas de reserva da semente, apontando, que essa fração pode ser mais bem investigada em ensaios futuros *in vitro* como precursora de peptídeos bioativos (SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008). Também como análise *in silico* pelo BIOPEP, para avaliar o potencial uso da aveia como fonte proteica na geração de peptídeos inibidores da ECA, os resultados apontaram que a protease Termolisina resultaria em mais fragmentos com essa atividade, o que, de fato, foi confirmado no ensaio experimental *in vitro*, revelando a eficiência e a eficácia na seleção teórica de proteases pelo BIOPEP (CHEUNG et al., 2009). Lau et al. (2014) encontraram três potentes peptídeos inibidores da ECA (RIGLF, AHEPVK e PSSNK) provenientes do cogumelo comestível *Agaricus bisporus* e realizaram uma simulação da digestão gastrointestinal (pepsina, tripsina e quimotripsina) *in silico* e, também, *in vitro* para comparar as respostas quanto a estabilidade desses peptídeos bioativos após a digestão gastrointestinal. A análise pelo BIOPEP revelou que os peptídeos RIGLF e PSSNK, após digestão, originaram, respectivamente, um tripeptídeo (IGL) e um tetrapeptídeo (SSNK), e o peptídeo AHEPVK foi o único estável ao processo de digestão. De fato, essas previsões foram confirmadas quando foram realizados experimentos e analisados por cromatografia por filtração em gel. Ressalta-se, no entanto, que embora o método *in silico* tenha mostrado boa capacidade preditiva, o trabalho experimental ainda é necessário para confirmar a real formação dos peptídeos bioativos, a sua reprodutibilidade e a comprovação do efeito biológico de interesse (UDENIGWE e ALUKO, 2012).

A etapa de obtenção dos peptídeos pela ação de hidrólise enzimática, os métodos mais utilizados para a detecção da atividade inibitória da ECA e as

estratégias que têm sido adotadas para alcançar a purificação dos peptídeos estão descritos mais detalhadamente a seguir.

1.3.1 Obtenção de peptídeos inibidores da ECA por hidrólise enzimática

Muitos peptídeos inibidores de ECA têm sido descobertos a partir de hidrólises enzimáticas de diversas fontes proteicas, empregando enzimas gastrointestinais, como pepsina, tripsina e quimotripsina, ou proteases obtidas de fontes bacterianas e fúngicas, como a Alcalase e a Termolisina (KORHONEN e PIHLANTO, 2006). Análises comparativas entre a atuação de diferentes enzimas constituem uma etapa fundamental na obtenção de peptídeos com atividade inibitória, uma vez que a especificidade dessas enzimas proteolíticas resulta em um perfil peptídico potencialmente capaz de inibir ou não a ação da ECA. Concentrados proteicos do grão de bico e da ervilha, por exemplo, apresentaram percentuais maiores de inibição da ECA quando hidrolisados pela combinação de enzimas gastrointestinais (pepsina/tripsina/quimotripsina) e pela ação da Papaína em relação a combinação das enzimas Alcalase/Flavourzyme (BARBANA e BOY, 2010), evidenciando a importância da escolha da enzima para formar peptídeos bioativos.

Além da especificidade proteolítica, as condições de hidrólise também influenciam na formação desses peptídeos e, conseqüentemente, no seu potencial de inibição da ECA. Parâmetros como temperatura, pH, relação enzima/substrato e tempo de hidrólise devem ser considerados (GUANG e PHILLIPS, 2009). Nesse sentido, a otimização do processo de hidrólise tem sido realizada por diferentes combinações entre esses parâmetros, as quais podem resultar em respostas positivas ou negativas na atividade biológica em questão. Em isolado proteico de aveia (CHEUNG et al., 2009), diferentes respostas na capacidade inibitória da ECA foram observadas nos hidrolisados obtidos por várias combinações entre a razão enzima/substrato e o tempo de hidrólise. Valores altos na relação enzima/substrato (3%) por um tempo curto de hidrólise (20 min) promoveram uma atividade maior de inibição quando comparado com valores baixos na relação enzima/substrato (0,1%) por um longo período de hidrólise (120 min), sugerindo que as condições hidrolíticas são capazes de influenciar na atividade biológica dos peptídeos formados.

O grau de hidrólise (em inglês, Degree of Hydrolysis - DH) tem sido considerado um parâmetro importante no monitoramento do ensaio de hidrólise, padronizando a obtenção do hidrolisado. O DH representa a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao número total de ligações peptídicas e, dependendo da extensão da hidrólise, normamente acima de 10%, pode resultar na formação de peptídeos com baixa massa molecular e, portanto, potenciais inibidores da ECA. Por outro lado, alguns estudos tem revelado que essa inibição também pode diminuir com hidrólises prolongadas, sugerindo que peptídeos inibidores podem ser formados inicialmente, e, subsequentemente, perderem sua estrutura ativa. (VERMEIRSEN et al., 2003). Em hidrolisados do soro de leite (VEN et al., 2002), a maior atividade de inibição foi obtida após 5 h de reação, atingindo 31% no valor de DH. No entanto, a extensão dessa hidrólise provocou a perda do efeito inibidor, revelando que existe um tempo de hidrólise ótimo na formação de peptídeos com capacidade de inibição da ECA. Do mesmo modo, alguns estudos tem reconhecido que altos valores do grau de hidrólise não garantem que esses peptídeos formados apresentem uma maior atividade inibitória. Chiang et al. (2006) compararam a atividade de inibição da ECA em isolados proteico de soja a partir de sua hidrólise pela ação de cinco enzimas proteolíticas (Alcalase, Flavourzyme, pepsina, tripsina e quimotripsina). Embora a enzima Flavourzyme tenha apresentado o maior grau de hidrólise (24%), seu hidrolisado obteve somente 70% da atividade inibitória da ECA ao passo que as demais enzimas avaliadas atingiram somente 10% no grau de hidrólise, mas promoveram uma inibição da ECA entre 80 a 90%. Como descrito anteriormente, a especificidade da enzima é determinante para gerar peptídeos com atividade biológica.

A simulação de uma digestão gastrointestinal *in vitro* permite avaliar a resistência de peptídeos bioativos que possam apresentar atividade inibitória da ECA. Isso é importante quando se considera o uso desses peptídeos como ingredientes em alimentos funcionais. No entanto, a mesma eficácia pode não ser garantida nos ensaios realizados *in vivo*, uma vez que o efeito fisiológico desejado depende, além da resistência à proteólise, do alcance desses peptídeos no tecido ou órgão-alvo para exercer seu efeito anti-hipertensivo (JAO et al., 2012). Nesse caso, ressalta-se a importância de que uma avaliação *in vitro* é um método preliminar utilizado para se conhecer as estruturas formadas desses peptídeos e sua potencialidade biológica antes de estudos *in vivo* (WILSON et al., 2011). Quist et al.

(2009) constataram a formação, *in vitro*, de peptídeos inibidores da ECA em amendoins crus e torrados tanto pela ação da Alcalase como também pela combinação das enzimas pepsina/pancreatina, indicando essa matriz como provável fonte de peptídeos anti-hipertensivos a partir da digestão *in vivo*. Tiengo et al. (2009) encontraram valores maiores de inibição da ECA no concentrado protéico do amaranto (com e sem tratamento térmico) quando pré-hidrolisado com a Alcalase seguida de uma simulação da digestão gastrointestinal (pepsina-pancreatina), sugerindo que a ingestão de proteínas previamente hidrolisada com Alcalase pode resultar em um efeito hipotensor *in vivo*.

De fato, muitos peptídeos tem revelado resistência à ação das proteases digestivas mantendo sua capacidade inibitória sobre a ECA ou, até mesmo, apresentado um aumento nessa atividade de inibição após a simulação da digestão. No entanto, muitos perdem sua estrutura ativa após a ação das enzimas gastrointestinais. Como exemplo, seis peptídeos identificados como potenciais anti-hipertensivos provenientes da caseína foram submetidos *in vitro* à hidrólise pelas enzimas digestivas e os resultados indicaram que apenas dois peptídeos tiveram um aumento na capacidade inibitória por apresentaram valores menores de IC_{50} , porém os demais tiveram sua potência de inibição reduzida, tendo um aumento na IC_{50} (CONTRERAS et al. 2013), apontando que a ação digestiva pode causar um efeito positivo ou negativo frente ao efeito inibidor.

Sendo assim, inúmeras estratégias em relação à proteólise têm sido aplicadas objetivando formar peptídeos inibidores da ECA com estruturas variadas a partir de diversas fontes proteicas e estabelecer um melhor entendimento na estreita relação entre estrutura-atividade em ensaios *in vitro*, oferecendo boas perspectivas para, posteriormente, avaliá-los em ensaios *in vivo*.

Diversos estudos têm revelado que peptídeos com inibição da ECA quando avaliados *in vitro* também demonstraram efeito hipotensor quando analisados *in vivo*. Como exemplo, Chen et al. (2013) avaliaram *in vivo* o efeito anti-hipertensivo dos peptídeos VNP e VWP quando purificados do hidrolisado da proteína do arroz (IC_{50} de 6,4 e 4,5 μ M, respectivamente). Os resultados *in vivo* revelaram que, após a administração oral individual de cada peptídeo a 5mg/kg em ratos espontaneamente hipertensivos (SHRs), a pressão arterial sistólica foi significativamente mais baixa para ambos os peptídeos em um período de 8 h, indicando que os mesmos foram resistentes à ação das enzimas digestivas, não perdendo seu efeito anti-

hipertensivo. Suetsuna et al. (1998) observaram que sete dipeptídeos isolados e purificados das proteínas do alho apresentaram atividade inibitória da ECA tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo o efeito anti-hipertensivo atribuído, principalmente, àqueles peptídeos que apresentaram tirosina em sua estrutura. Por outro lado, alguns estudos apontaram a perda do efeito anti-hipertensivo *in vivo* após o processo de digestão como, por exemplo os peptídeos RPYL, LIWKL, LNNSRAP, derivados da lactoferrina bovina, que perderam seu efeito hipotensor após 2 h pós-administração em SHRs (RUIZ-GIMENEZ et al., 2012). Atribuiu-se esses resultados a degradação dos peptídeos ativos após a digestão das enzimas digestivas, sendo previamente verificado nas análises *in vitro*.

Ressalta-se que embora os estudos em sua maioria tem indicado de forma positiva o efeito anti-hipertensivo pelos peptídeos isolados de diversas fontes proteicas, ainda não superam a ação prolongada das drogas sintéticas. Desse modo, o consumo de peptídeos bioativos de fontes proteicas alimentares contribuiria na manutenção da pressão arterial, principalmente daqueles indivíduos em estágios de pré-hipertensão (NEVES et al., 2006).

1.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade inibitória da ECA

Diversos métodos têm sido utilizados para uma pré-avaliação da atividade biológica de peptídeos provenientes de hidrolisados proteicos através de ensaios *in vitro* de inibição da ECA.

O método mais comumente utilizado para medir a atividade de inibição *in vitro* é baseado no protocolo desenvolvido por Cushman e Cheung (1971) e tem sido aplicado por diversos autores. O método baseia-se na hidrólise do tripeptídeo Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) pela ECA, formando ácido hipúrico (HA) e Histidil-Leucina (HL) como produtos. O HA é extraído com acetato de etila e quantificado em espectrofotômetro a absorvância em 228nm. Entretanto, este método apresenta algumas desvantagens, tais como o emprego de várias etapas para extrair e quantificar o produto da reação e o fato de que tanto o substrato (HHL) quanto o produto (HA) apresentarem máximo de absorção a 228 nm, podendo superestimar a quantidade do produto formado.

Diante disso, um método alternativo mais confiável para o ensaio da reação de catálise da ECA foi desenvolvido por Wu et al. (2002) pela completa separação do HA e do HHL pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Mais recentemente, um método mais rápido e mais sensível foi desenvolvido para avaliar a atividade da ECA utilizando um substrato fluorogênico baseado na Técnica de Transferência de Energia de Fluorescência por Ressonância (FRET) (CARMONA et al., 2006). O método consiste na hidrólise pela ação da enzima conversora da angiotensina de um peptídeo sintético com supressão intramolecular de fluorescência. O substrato fluorogênico utilizado é o Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH (simplificado para Abz-FRK(Dnp)-P-OH), no qual o Abz (ácido o-amino benzóico) é o grupo fluorescente ligado ao grupo N-terminal do peptídeo sintético Phe-Arg-Lys e o grupo receptor Dnp (2,4-dinitrofenil) está incorporado ao ϵ -amino grupo de um aminoácido da cadeia peptídica. Ao ser hidrolisado pela enzima, o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH sofre a liberação do produto Abz-FR, emitindo fluorescência. O método é bastante vantajoso em relação àquele relatado anteriormente, sendo bastante sensível, rápido, simples e econômico, além de permitir o monitoramento do ensaio em tempo real. O método tem sido utilizado amplamente em ensaios na determinação da atividade da ECA na área da saúde, principalmente em tecidos e no plasma, apresentando boa correlação com o método utilizando o substrato HHL (ALVES et al., 2005). Assim, o método também pode ser aplicado na determinação da atividade de inibição da enzima por peptídeos bioativos isolados de diferentes fontes proteicas.

1.3.3 Técnicas de fracionamento e purificação dos peptídeos bioativos

A separação de peptídeos bioativos a partir de hidrolisados proteicos é uma etapa fundamental para a investigação das propriedades biológicas. No hidrolisado total, há a presença de peptídeos bioativos juntamente com outras sequências peptídicas (POULIOT et al., 2006) e, além disso, o efeito bioativo observado nesse hidrolisado pode ser resultante de um sinergismo entre as moléculas. Nesse sentido, etapas de fracionamento dessa mistura peptídica são necessárias para discriminar as diferenças mais sutis entre as frações quanto à bioatividade, até que se isolem os peptídeos mais potentes. Em outras palavras, o ensaio da atividade biológica de

cada fração resultante do processo de separação deve ser capaz de apontar claramente o efeito bioativo em questão para que apenas a fração que contém os peptídeos de interesse seja, ao final, submetida à etapa de purificação (PIMENTA, 2009).

Existe uma grande variedade de métodos visando à separação de biomoléculas, utilizando técnicas mais simples como ultrafiltração por membrana de exclusão molecular e/ou técnicas cromatográficas, de acordo com as diferentes propriedades dos hidrolisados quanto à massa molecular, carga elétrica, solubilidade e afinidade. Portanto, as técnicas aplicadas têm por objetivo isolar essas moléculas bioativas de uma mistura complexa, sendo importante encontrar um equilíbrio entre a pureza e a eficiência de cada técnica utilizada (GUANG et al., 2009; POULIOT et al., 2006).

Entre as diversas técnicas utilizadas para o fracionamento e purificação peptídica estão a cromatografia por fase reversa (em inglês, RP-HPLC), cromatografia de troca-iônica (em inglês, IEC) e a cromatografia por exclusão molecular, conhecida também, como filtração em gel (em inglês, SEC) (POULIOT et al., 2006). A cromatografia por fase reversa tem sido a técnica mais utilizada como estratégia no fracionamento, principalmente na etapa de purificação peptídica tendo sido aplicada em diversos estudos, como, por exemplo, no isolamento de peptídeos inibidores da ECA provenientes das proteínas do leite de soja (TOMATSU et al., 2013) e também do isolado proteico de soja (LO E LI-CHAN et al., 2005; GOUDA et al., 2006), da canola (WU et al., 2008) e das proteínas do amendoim (QUIST et al., 2009; GUANG e PHILLIPS, 2009). O hidrolisado obtido da proteína de reserva (legumina) do grão de bico pela ação da Alcalase, por exemplo, foi fracionado por cromatografia em fase reversa e resultou em seis potentes peptídeos inibidores da ECA (YUST et al., 2003), mostrando que a técnica cromatográfica foi eficaz para o isolamento dos peptídeos bioativos presentes no hidrolisado total.

No entanto, ressalta-se que é possível realizar a combinação entre os métodos de modo que se complementem e resultem em uma separação ainda mais eficiente e facilitem a identificação dos peptídeos bioativos (PANCHAUD et al., 2012). Por exemplo, para o hidrolisado proteico do salmão, foram empregadas três técnicas cromatográficas (IEC, SEC e RP-HPLC) distintas e consecutivas para a separação e purificação dos peptídeos inibidores da ECA, promovendo uma melhor eficiência na identificação de três peptídeos bioativos com IC₅₀ entre 7,7 µM a 10,7

μM (AHN et al., 2012). No hidrolisado obtido de duas frações proteicas (lisozima e cistatina) do ovo, as etapas de separação consistiram em uma ultrafiltração em membrana de exclusão molecular, cromatografia por filtração em gel e, posteriormente, cromatografia em fase reversa. A fração ativa foi identificada como sendo dois peptídeos inibidores da ECA caracterizados pelas sequências SWVE e DILN (POKORA et al., 2014), revelando que as técnicas escolhidas foram eficientes no isolamento desses peptídeos.

Uma vez que a fração peptídica com atividade é revelada, o sequenciamento por espectrometria de massas (em inglês, MS) tem sido a principal ferramenta utilizada para determinar a sequência do(s) peptídeo(s) e identificá-los para que, então, se estabeleça a relação estrutura-atividade. Após essa identificação, a última etapa que se segue na análise *in vitro* de peptídeos bioativos é a sua síntese, objetivando validar a bioatividade, determinar o valor de IC_{50} e estabelecer o tipo de inibição.

De uma maneira geral, a grande maioria dos peptídeos inibidores da ECA são competitivos quanto ao modo de inibição. Como, por exemplo, os peptídeos VNP VWP, obtidos da hidrólise das proteínas do arroz (CHEN et al., 2013) e o peptídeo VLIVP obtidos da hidrólise da principal proteína de reserva da soja (glicinina) (GOUDA et al., 2006) foram reportados como inibidores competitivos. No entanto, peptídeos não-competitivos e incompetitivos também já foram identificados em fontes proteicas como, por exemplo, no cogumelo (JANG et al., 2011), no salmão (LEE et al., 2014) e na fração albumina do amaranto (TOVAR-PÉREZ et al., 2009). Sendo assim, o mecanismo de inibição da ECA não segue um modelo único para descrever a relação estrutura-atividade (JAO et al., 2012), uma vez que a interação dos inúmeros peptídeos inibidores da ECA identificados em diversas fontes proteicas depende de suas características individuais.

1.4 SEMENTES COMESTÍVEIS COMO FONTES PROTEICAS ALTERNATIVAS

O Brasil possui inúmeras frutas nativas com sementes comestíveis, principalmente na região da Amazônia, que apesar do grande potencial nutricional e socioeconômico, são ainda pouco conhecidas. As formas de aproveitamento desses frutos são variadas, indo do consumo *in natura* à utilização de sua polpa para a

fabricação de sucos na indústria de alimentos. No entanto, o consumo de suas amêndoas e castanhas, frescas ou após algum tipo de processamento é, normalmente, restrito a população local, sendo consideradas resíduos durante o processamento industrial desses frutos. Desse modo, existe interesse no aproveitamento dessas sementes como fontes alternativas de nutrientes para a dieta humana. As informações sobre a composição química de sementes tropicais, principalmente originadas de frutos nativos, indicam um bom potencial de aproveitamento nutricional ou de desenvolvimento de novos produtos a partir das reservas de proteínas, que apresentam teores, em média, de 8 a 20% em nozes e sementes comestíveis (FREITAS e NAVES, 2010).

Uma vez que essas sementes podem ser aproveitadas como fontes de proteína, outro uso seria para a obtenção de hidrolisados proteicos com atividade biológica. Desse modo, a obtenção de peptídeos derivados de hidrólise proteica com atividade biológica diferenciada representam uma nova oportunidade de aproveitamento de sementes comestíveis que constituem fontes proteicas pouco exploradas. Entre as diversas sementes de frutos nativos com teor proteico relevante, destacam-se as de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).

1.4.1 A semente de cupuaçu como fonte de peptídeos bioativos

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é um fruto nativo da Amazônia e está entre as 22 espécies mais conhecidas do gênero *Theobroma*, ocupando o segundo lugar do gênero em relação ao potencial econômico, sendo o cacau (*Theobroma cacao*) a ocupar a primeira posição. O cupuaçu tem conquistado mercado devido ao sabor exótico de sua polpa, que apresenta excelentes características de aroma, sabor e textura sendo bastante apreciada no preparo de sucos, sorvetes e cremes (LOPES et al., 2008; ROCHA NETO et al., 1997; GONDIM et al., 2001). No entanto, a utilização das sementes comestíveis desse fruto é, normalmente, restrita a população local, sendo consideradas resíduos durante o beneficiamento do fruto. No Brasil, a produção de cupuaçu está concentrada na maioria dos estados da região Norte, sendo Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e Roraima os maiores produtores do fruto no país (ESCRIVÁ, 2002; GONDIM et al., 2001). Em 2012, o estado do Pará ocupou o primeiro lugar como produtor com uma produção de 74.524 toneladas do

fruto, com um crescimento em torno de 80% na produção em relação aos quatro anos anteriores, de acordo com os dados estatísticos divulgados pela Secretaria de Agricultura do Estado do Pará (SAGRI)² (**Figura 3**).

Figura 3 - Quantidade de cupuaçu produzido (toneladas) no período entre 2003 a 2012 no estado do Pará. Fonte: LSPA/IBGE.

A composição média relativa ao peso dos frutos corresponde a 43% de casca, 38% de polpa e 17% de sementes, sendo que o rendimento da polpa varia com o tamanho do fruto, genótipo, localidade de produção e período de colheita (VENTUERI et al., 1993; ROCHA NETO et al., 1999). O cupuaçu apresenta, em média, 36 sementes por fruto, sendo que essa quantidade depende da sua variedade, que são agrupadas de acordo com o seu formato. A variedade Redondo é a mais cultivada, sendo conhecida pela sua forma arredondada, a variedade Mamorana é caracterizada pela sua forma alongada e a variedade Mamau é conhecida por não apresentar sementes e seu formato é semelhante à variedade Redondo (GONDIM et al., 2001). Ainda em relação às sementes de cupuaçu, elas apresentam alto valor nutritivo, com aproximadamente 9,27% de proteínas, 65% de gordura, 15,54% de carboidratos, além de 7,14% de fibras (COHEN et al., 2004).

Em razão de constituir um expressivo resíduo e de apresentar composição nutricional relevante, houve um aumento das pesquisas voltadas para o

² SAGRI: http://www.sagri.pa.gov.br/publicacoes/view/77/a_fruticultura_no_estado_do_para

aproveitamento das sementes de cupuaçu devido à semelhança de suas amêndoas com as do cacau. Mesmo sendo morfológicamente distinto, o cupuaçu apresenta grande proximidade filogenética ao cacau, pois ambos pertencem ao mesmo gênero, e as semelhanças entre essas duas espécies têm sido evidenciadas em relação às proteínas e às propriedades de suas sementes (REISDORFF et al., 2004; SILVA e FIGUEIRA, 2005; LOPES et al., 2008). O perfil proteico das sementes do cupuaçu e do cacau é bastante similar, sendo caracterizado pela predominância das frações albumina e globulina, sendo esta última a principal proteína de reserva de ambas as sementes (REISDORFF et al., 2004; VOIGT et al., 1993). A similaridade observada para a fração globulina entre essas espécies já foi comprovada pelo nível de identidade dos genes entre o gênero *Theobroma*, equivalente a 99% (WITHLOCK e BAUM, 1999). Desse modo, o aroma análogo ao chocolate, obtido a partir das sementes de cupuaçu, é atribuído à semelhança proteica entre as espécies, uma vez que a hidrólise enzimática das proteínas de reserva das sementes do cacau está associada ao desenvolvimento do aroma característico do chocolate durante o processo de aproveitamento da semente, sendo alcançado após as etapas de fermentação, secagem e torração.

Durante a fase de fermentação anaeróbica, as leveduras consomem os açúcares da polpa mucilagínosa aderida à semente, produzindo etanol e, posteriormente, ácido acético e láctico. O aumento da acidez e da temperatura provocam a morte do embrião e a desestruturação das membranas celulares facilitando a mobilização dos substratos e a atuação de enzimas, provocando uma série de reações relacionadas ao sabor, aroma e cor (AFOAKWA et al., 2009; KRATZER et al., 2009; REISDORFF et al., 2004). Estas alterações resultam da ação de duas enzimas endógenas sobre as proteínas de reserva das sementes. A endoprotease aspártica libera peptídeos hidrofóbicos no pH 3,5 ao passo que a carboxipeptidase libera peptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres no pH 5,2 (REISDORFF et al., 2004; VOIGT et al., 1994; KIRCHHOFF et al., 1989). Nesse contexto, diversos estudos têm mostrado que peptídeos hidrofóbicos, hidrofílicos e aminoácidos livres formados pela ação das duas enzimas endógenas (endoprotease aspártica e carboxipeptidase) durante o processo de fermentação do cacau, e de seu análogo cupuaçu, são os principais precursores do aroma característico dessas sementes (REISDORFF et al., 2004; VOIGT et al., 1994). Após a fermentação, secagem e torração (**Figura 4**), há o escurecimento da semente pela reação de

Maillard devido à interação entre açúcares redutores e aminoácidos livres gerando compostos aromáticos, tais como álcoois, ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, ésteres, aminas e pirazinas (BONHEVÍ, 2005).

Figura 4 – Etapas de processo do aproveitamento das sementes de cupuaçu: semente fresca (*in natura*), ainda com resíduos de polpa aderida (A), fermentada e seca (B) e torrada (C).

Tendo em vista que, atualmente, as sementes de cupuaçu são consumidas apenas pelas populações locais, diversas oportunidades de aproveitamento dessas sementes tem surgido para valorizar esta matéria-prima e elaborar subprodutos com características organolépticas similares às do chocolate. Nos últimos anos, o cupuaçu tem atraído interesse na área de tecnologia de alimentos, visando a aplicação do “cupulate” como um substituto do chocolate (MEDEIROS et al, 2010; LOPES et al., 2008; LANNES et al., 2002), obtendo produtos análogos como, por exemplo, o liquor de cupuaçu (COHEN et al., 2005), a aplicação do pó de cupuaçu para obtenção de bolo de “chocolate” (ESTELLER et al., 2006) e o achocolatado de cupuaçu (LANNES et al., 2003).

Além dos estudos relacionados à aplicação tecnológica, a qualidade proteica e o valor biológico das proteínas das sementes têm sido comparados. A avaliação da qualidade proteica da semente de cupuaçu fermentada e torrada revelou teores de leucina, isoleucina e tirosina superiores aos do cacau (LOPES et al. 2008). Por outro lado, a valina e a histidina foram os aminoácidos limitantes para o valor nutritivo das proteínas na semente de cupuaçu *in natura* enquanto que nas amêndoas fermentadas e torradas, houve uma redução adicional (~15%) nos teores de lisina (CARVALHO et al., 2008). Além disso, foi observado um maior valor biológico para as proteínas do pó de cupuaçu em comparação às proteínas do cacau, uma vez que promoveram maior crescimento em ratos alimentados com as rações adicionadas dessas sementes (LOPES et al., 2008).

1.5 JUSTIFICATIVA

Como apresentado acima, as sementes de cupuaçu possuem teor proteico relevante e uma considerável qualidade proteica, com grande potencial para sua utilização na indústria de alimentos. Contudo, ainda não há estudos voltados para a avaliação dessas proteínas como precursoras de peptídeos bioativos. Como mencionado anteriormente, proteínas capazes de originar peptídeos com atividade biológica específica já foram encontradas em sementes comestíveis com alto valor proteico, como o amendoim (JAMDAR et al., 2010; QUIST et al., 2009) e o amaranto (TIENGO et al., 2009; SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008). No entanto, o conhecimento disponível acerca de peptídeos bioativos obtidos a partir das sementes das espécies do gênero *Theobroma* é bastante limitado, sendo algumas evidências relatadas apenas para a espécie *Theobroma cacao* (cacau). Sabe-se que as proteínas de reserva do cacau e, também, as de cupuaçu constituem a principal fonte de peptídeos, pois, como já descrito, o processo proteolítico a partir dessas proteínas durante a fermentação resulta em peptídeos hidrofóbicos, hidrofílicos e aminoácidos livres essenciais para a formação do aroma característico de ambas as sementes. Nesse contexto, os aminoácidos hidrofóbicos aparecem em uma proporção elevada em relação aos demais aminoácidos após o processo fermentativo nas sementes do cacau (KIRCHHOFF et al., 1989) e do cupuaçu (ROHSIUS et al., 2006). De fato, há evidências experimentais de que os peptídeos resultantes da atuação das próprias enzimas endógenas nas proteínas da semente do cacau apresentam atividade inibitória da ECA e, também, capacidade antioxidante (SAMADI et al., 2011).

No entanto, o processo de aproveitamento das sementes frescas de cupuaçu é restrito às regiões de produção, sendo ainda consideradas como resíduo na indústria de alimentos. Diante das características composicionais de peptídeos estarem diretamente ligadas à capacidade de apresentarem atividades biológicas específicas, como, por exemplo, a atividade inibitória da ECA, é possível que sejam produzidos peptídeos inibidores a partir das proteínas de reserva das sementes frescas pela ação de proteases com especificidade para aminoácidos hidrofóbicos, uma vez que a composição de aminoácidos hidrofóbicos na semente de cupuaçu é bastante considerável (CARVALHO et al., 2009). Entretanto, é importante ressaltar que peptídeos com essa atividade inibitória não são caracterizados apenas pela

composição de aminoácidos, mas também são influenciados, principalmente, pelas sequências de aminoácidos.

A esse respeito, uma avaliação *in silico* da potencial presença de peptídeos com atividade biológica pode ser feita utilizando o banco de dados *on line* BIOPEP (MINKIEWICZ et al., 2008), como já descrito anteriormente. Uma avaliação *in silico* na sequência da proteína de reserva do cacau (ID: 1114) efetuada no início desse projeto, empregando as ferramentas do BIOPEP, constatou potenciais fragmentos peptídicos com capacidade de inibição da ECA. De fato, essa previsão *in silico* corrobora as evidências dessa atividade biológica observadas para as proteínas da semente do cacau, como mencionado anteriormente (SAMADI et al., 2011).

Uma vez que estudos demonstram a similaridade da fração globulina entre as duas espécies e já foi constatada a formação de peptídeos com atividade biológica a partir de suas proteínas de reserva no cacau, é bastante provável que as proteínas de reserva das sementes frescas de cupuaçu também sejam precursoras de peptídeos bioativos, com destaque para aqueles com atividade inibitória da ECA.

Diante do crescimento produtivo de cupuaçu, o potencial de formação de peptídeos bioativos a partir de isolados proteicos da semente fresca poderá contribuir para um maior aproveitamento das sementes e, conseqüentemente, maior valor comercial desse fruto, uma vez que seu valor econômico, atualmente, é fortemente baseado apenas na comercialização da polpa, enquanto as suas sementes ainda são pouco aproveitadas pela indústria de alimentos.

2. OBJETIVO

Avaliar, *in vitro*, a presença de peptídeos bioativos com ação inibitória sobre a ECA em isolado proteico da semente fresca de cupuaçu.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o isolado proteico da semente fresca de cupuaçu;
- A partir do isolado proteico, obter o hidrolisado pela ação enzimática da Alcalase e verificar a eficácia dessa digestão *in vitro* na obtenção de peptídeos;
- Avaliar o efeito inibitório do hidrolisado sobre a ECA;
- Fracionar o hidrolisado para identificar as frações peptídicas com maior atividade de inibição;
- Sequenciar os peptídeos detectados nas frações peptídicas com maior atividade de inibição da ECA;
- Sintetizar os peptídeos identificados nessas frações, determinar o valor de IC_{50} e estabelecer o tipo de inibição por meio da cinética enzimática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

As sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) da variedade Redondo foram provenientes do cultivo comercial da Fazenda Riachuelo, localizada no município de Ilhéus, no estado da Bahia, Brasil. Dez quilos de semente fresca (*in natura*) (**Figura 5**) foram colhidas em março/2011, sendo imediatamente congeladas (-20°C) após sua colheita, de acordo com as informações relatadas pelo produtor.

As sementes frescas, previamente congeladas, tiveram suas cascas removidas para a obtenção da parte comestível (cotilédone) que foi triturada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer a -80°C. Aproximadamente 500 g de material triturado da semente fresca foram utilizados para análises posteriores.

Figura 5 – Sementes frescas (*in natura*) de cupuaçu ainda com resíduos de polpa aderida.

3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

3.2.1 Determinação do teor de umidade

Aproximadamente 1 g de amostra triturada da semente fresca foi pesada em cadinho previamente preparado para esta análise. A umidade foi determinada em

estufa com circulação de ar, baseando-se no método da AOAC, 930.15, sendo a análise realizada em triplicata.

3.2.2 Determinação dos lipídeos

Os lipídeos foram extraídos utilizando-se o método de Soxhlet a partir de 2 g de amostra liofilizada da semente fresca baseando-se no método da AOAC, 2003.06, sendo a análise realizada em triplicata.

3.2.3 Determinação do teor de proteínas

Para esta análise foram utilizados aproximadamente 60 mg de amostra liofilizada e desengordurada da semente fresca. O teor de proteínas foi determinado de acordo com o método proposto pela AOAC, 960.52, sendo a análise realizada em triplicata.

3.2.4 Determinação do teor de cinzas

Para esta análise foram pesados 2 g de amostra liofilizada e desengordurada da semente fresca em cadinho previamente preparado para esta análise. O material foi incinerado em mufla a 550°C. A análise do teor de cinzas foi baseada no método 900.02A da AOAC (2000), sendo realizada em triplicata.

3.2.5 Determinação de carboidratos

O teor de amido foi determinado por método enzimático, como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). Aproximadamente 0,5 g de amostra liofilizada e desengordurada da semente fresca foram homogeneizados em 5 mL de NaOH 0,5 N em homogeneizador tipo Potter por 5 min. Para a neutralização foram adicionados 5 mL de ácido acético 0,5 N. Esta solução foi transferida para balão volumétrico (25

mL), completando-se o volume com água desionizada. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de centrifuga (15 mL), adicionada de 4 mL de etanol absoluto e centrifugada a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes com o auxílio de 4 mL de etanol 80% e centrifugado nas condições descritas anteriormente. Após o descarte do sobrenadante e evaporação do etanol, foi adicionado ao precipitado 1 mL de amiloglicosidase (14 U.mL⁻¹; pH 4,8), seguido por incubação a 37°C por 2 h. A reação foi interrompida por 100 µL de ácido perclórico 0,6 N. A glicose resultante foi quantificada através do método de glicose/peroxidase/ABTS, segundo Bergmeyer (1974), utilizando-se curva-padrão de glicose.

Os açúcares solúveis foram extraídos três vezes com etanol 80% a 80°C. Após a centrifugação, alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas e submetidas a evaporação do etanol em concentrador speed-vac. O teor de açúcares solúveis foi analisado por HPLC (DX500, EUA), utilizando um detector de pulso amperométrico e coluna CarboPac PA1 (250 x 4 mm), em corrida isocrática com fluxo de 1 mL.min⁻¹ de NaOH (18 mM). Os açúcares solúveis totais foram determinados como a soma dos valores de glicose, frutose e sacarose.

3.2.6 Determinação do teor de fibras

A fibra alimentar (solúvel, insolúvel e total) foi determinada segundo o método enzimático-gravimétrico. Para esta análise, 1 g de amostra liofilizada e desengordurada da semente fresca, em triplicata, foi submetida à digestão enzimática sequencial por amilase termoestável, protease e amiloglicosidase de acordo com o método da AOAC, 991.43 e AACC 32-07.

3.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO

As etapas de preparação da amostra e obtenção do hidrolisado proteico estão descritas a seguir.

3.3.1 Preparo da amostra

Antes da obtenção do isolado proteico, 60 g de sementes frescas, previamente trituradas, foram liofilizados e desengordurados no extrator Soxhlet por aproximadamente 18 h, utilizando como solvente éter etílico. O material desengordurado foi mantido em capela sob ventilação por uma hora para a evaporação do solvente residual e, posteriormente, armazenado em dessecador. O mesmo material foi submetido a uma extração com clorofórmio por 8 h, também no Soxhlet, para a remoção parcial de alcaloides, como proposto por Voigt et al. (1993).

Após essas etapas, foi realizada, também, a remoção parcial dos compostos fenólicos presentes na amostra de acordo com Amin et al. (2002) e Voigt et al. (1993). Aproximadamente 25 g de material desengordurado da semente fresca foram submetidos a três lavagens em acetona fria 80% (5:100 v/v) contendo 0,1% de ácido tioglicólico. A suspensão foi agitada por 1 h a 4°C e, então, centrifugada a 10.000 x g por 15 min a 4°C. Posteriormente, esse material foi lavado mais três vezes em acetona fria a 70% contendo, também, 0,1 % de ácido tioglicólico e a suspensão foi agitada por 30 min a 4°C e centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a remoção da água residual e com o objetivo de uma melhor extração, o material foi submetido a duas lavagens em acetato de etila por 30 min a 4°C e centrifugada a 10.000 x g por 15 min a 4°C. O solvente residual presente no material foi evaporado em concentrador speed-vac (SC210A, Savant).

Para verificar a eficiência da remoção desses fenólicos, uma pequena porção do material obtido de cada semente foi dispersado com 2 mL de 5 M HCl e aquecida por poucos segundos. O desenvolvimento de cor rosa indicou a presença residual de compostos fenólicos.

O material obtido da semente fresca foi armazenado em dessecador a temperatura ambiente para posterior obtenção do isolado proteico.

3.3.2 Obtenção do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu

O isolado proteico foi obtido de acordo com o descrito por Carvalho et al. (2009). O material obtido na etapa anterior foi disperso em água na proporção de 1:15 (m/m), adicionando-se NaOH 1 N para se obter pH 9,0. A suspensão foi

mantida sob agitação durante 1 h e, em seguida, centrifugada a 1.500 x g por 20 min. O precipitado foi submetido a duas lavagens consecutivas em solução alcalina de mesmo pH, a fim de se obter a maior recuperação possível de proteínas.

Ao sobrenadante foi acrescentada solução de HCl 1 N, até se obter o pH 3,5 (CARVALHO et al., 2009). Esta suspensão foi mantida sob agitação durante 30 min e centrifugada a 1.500 x g por 20 min. O precipitado foi submetido a duas lavagens consecutivas em solução ácida, pH 3,5 (pH do ponto isoelétrico das proteínas).

O precipitado obtido foi liofilizado, constituindo-se no isolado proteico e o teor proteico foi determinado pelo método de Kjeldahl, usando o fator de conversão 6,25.

3.3.3 Determinação da composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos totais do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu foi realizada pelo Laboratório de Fontes Proteicas, no Departamento de Alimentos e Nutrição, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O método cromatográfico foi aplicado de acordo com White et al. (1986). Para o aminoácido triptofano, o ensaio foi determinado após hidrólise enzimática com pancreatina e reação com ácido glioilico e quantificado por reação colorimétrica a 540 nm.

3.3.4 Obtenção do hidrolisado a partir do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu

Para a obtenção do hidrolisado proteico a partir do isolado, foi realizada a digestão *in vitro* com a enzima Alcalase (Subtilisina A, EC: 3.4.21.62), uma protease alcalina de uso industrial produzida por fermentação submersa do microorganismo *Bacillus licheniformis* que tem sido utilizada na preparação de diversos hidrolisados proteicos com respostas positivas na atividade inibitória da ECA.

Aproximadamente 143 mg de isolado proteico da semente fresca, correspondentes a 120 mg de proteína, foram pesados em tubo de centrífuga e dispersados em 12 mL de tampão fosfato de sódio (0,01 M, pH 7,5). A amostra foi pré-incubada por 20 min a 60°C antes da adição da enzima e uma alíquota foi

tomada para representar a amostra controle (tempo 0 h) do ensaio. Posteriormente, a enzima Alcalase (Sigma Aldrich, 2,4L) foi adicionada na proporção de 0,3 Unidades Anson (AU) por grama de proteína. Durante a reação, 1,5 mL foram retirados do tubo nos tempos 1, 2, 4, 6 e 8 h de hidrólise. Paralelamente a esse ensaio, 1,5 mL foram retirados nos mesmos intervalos de tempo de um segundo tubo contendo apenas a enzima em 12 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5), sendo mantido nas mesmas condições de hidrólise descritas anteriormente. Desse modo, essas alíquotas recolhidas foram consideradas como o branco da reação (ou branco da enzima) em cada tempo avaliado. Em ambos os tubos, o pH da reação foi controlado por meio de um pHmetro com sensor de temperatura, adicionando-se gotas de solução NaOH 1 N durante as oito horas de ensaio (adaptado de QUIST et al., 2009).

Para cada tempo de hidrólise determinado, as alíquotas tomadas foram destinadas para análises na obtenção do grau de hidrólise (Descrito no item **3.4**) e para o ensaio da atividade inibitória da ECA (Descrito no item **3.7**).

Para a obtenção do grau de hidrólise (DH), alíquotas de 500 µL de hidrolisados obtidos em diferentes tempos de proteólise foram retiradas do tubo de reação e centrifugadas a 1.400 x g por 5 min. Posteriormente a essa centrifugação, 250 µL de sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 2 mL de 1% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e incubados por 15 min a 75°C. Cada hidrolisado foi congelado (-20 °C) para posterior determinação do valor do grau de hidrólise.

Para o ensaio da atividade inibitória da ECA, alíquotas de 1 mL de hidrolisado tomadas em diferentes intervalos foram transferidos para um novo tubo e a reação enzimática foi interrompida por incubação em banho controlado a 90°C por 15 min. Cada hidrolisado foi congelado (-20°C) para posterior ensaio da atividade inibitória da ECA.

3.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE (DH)

O grau de hidrólise foi determinado pela reação colorimétrica do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com os grupos α -amino das proteínas e peptídeos formados durante a reação de hidrólise segundo o método de Adler-Nissen (1979), adaptado para ensaio em microplaca como descrito por Ven et al. (2002).

Um volume de 15 µL de cada hidrolisado, assim como também da amostra controle e do branco da enzima (todos previamente diluídos em 1% de SDS) foram transferidos para microplaca, acrescentando-se 45 µL de tampão fosfato de sódio (0,2125 M, pH 8,2). Em seguida, foram adicionados 45 µL de 0,05% TNBS e, imediatamente, incubados a 50°C por 1 h com leve agitação e proteção da luz. A reação foi interrompida por adição de 90 µL de HCl 0,1 M. A leitura foi feita por absorbância a 340 nm em leitor de microplaca (Synergy H1, Biotek), utilizando-se como curva padrão o aminoácido L-leucina com diluições entre 0,25 a 2,5 mM em 1% de SDS.

Para a determinação do valor do grau de hidrólise, foi utilizada a seguinte equação:

$$DH = (h / h_{total}) \times 100\% \quad (1)$$

sendo:

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 a amostra controle, ou seja, amostra não hidrolisada (tempo 0 h), e, também, do branco da enzima;

h_{total} = número total de ligações peptídicas por unidade de massa proteica cujo valor foi obtido a partir da soma de todos os aminoácidos constituintes em mmol.g⁻¹ de proteína. O valor do h_{total} obtido para a semente de cupuaçu foi de 7,6 mmol.g⁻¹ de proteína a partir da composição aminoacídica descrita no item **3.3.3**.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A determinação do perfil eletroforético das proteínas da farinha seca e desengordurada da semente de cupuaçu, do isolado proteico e dos hidrolisados obtidos em diferentes tempos de ensaio foi realizada de acordo com Carvalho et al. (2009), baseada no original Laemmli (1970), com algumas modificações.

As amostras de farinha seca e desengordurada da semente de cupuaçu e o isolado proteico (0,4% de proteína) foram dispersas em 1 mL de tampão contendo 42,5 % de água Mili-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. Em relação aos hidrolisados, foram tomados diretamente 20 µg de proteína e dispersos no mesmo tampão

descrito anteriormente na proporção 1:1. Após a dispersão, as amostras foram agitadas em vortex durante 5 min, aquecidas a 95°C por 5 min e, após resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min. Após essa etapa, alíquotas de 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram aplicadas em cada poço no gel, correspondendo, portanto, a 20 µg de proteína.

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

A separação foi conduzida sob voltagem constante (200V) por aproximadamente 45 min a 4°C. O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% em ácido acético 10% e etanol 40% por 24 h e, posteriormente, descorado para revelação das bandas com solução descoradora (etanol 5% e ácido acético 7,5%).

Para calcular a massa molecular aparente de cada banda por comparação com o padrão de massa molecular foi utilizado o software *Quantity-One* (BioRad).

3.6 ULTRAFILTRAÇÃO DOS HIDROLISADOS POR EXCLUSÃO MOLECULAR

Os hidrolisados obtidos foram centrifugados a 2.600 x g por 15 min a 10°C e os sobrenadantes foram filtrados, inicialmente, em filtro de nylon de 0,45 µm, a fim de remover qualquer material particulado remanescente da centrifugação. Posteriormente, esses sobrenadantes foram ultrafiltrados em membrana de exclusão molecular YM-3 (3 kDa, Amicon), centrifugando as amostras a 14.000 x g por 30 min a 10°C. As frações ultrafiltradas foram liofilizadas, ressuspensas em 100 µL de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,3) contendo NaCl 0,3 M e armazenadas a -20°C até a sua utilização no ensaio da atividade inibitória da ECA.

3.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA

O ensaio para a atividade inibitória da ECA foi realizado de acordo com Lahogue et al. (2010), adaptado dos originais Cushman e Cheung, (1971) e Wu et al. (2002) com algumas modificações. Cada etapa está descrita nos subitens a seguir.

3.7.1 Preparação da enzima conversora da angiotensina I

A enzima conversora da angiotensina I (EC 3.4.15.1) proveniente de pulmão de coelho (0,25U, Sigma A-6778) foi diluída em água deionizada. Preparou-se a solução a uma concentração de 100 mU/mL e alíquotas de 250 µL e também de 50 µL foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas para os dois métodos utilizados para o ensaio de inibição da ECA descritos a seguir.

3.7.2 Determinação da inibição da ECA com o substrato HHL

O substrato Hipuril-His-Leu (HHL) foi dissolvido em tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,3) contendo NaCl 0,3 M para a concentração final de 5 mM. A preparação da solução do substrato foi realizada a cada dia de ensaio.

Um volume de 25 µL do hidrolisado (ou tampão borato substituindo o extrato para ser utilizado como amostra controle) e 40 µL da ECA foram misturados e incubados por 10 min a 37°C sob agitação constante a 450 rpm. Após esse período, foram adicionados 100 µL do substrato HHL em cada tubo, permanecendo sob incubação por 30 min. A reação foi interrompida por adição de 70 µL de HCL 1M. Após o ensaio, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e filtradas em filtro de nylon 0,45 µm para serem injetadas no cromatógrafo. A quantidade de produto liberado, ou seja, o ácido hipúrico (HA) formado durante a reação enzimática foi analisada por HPLC (1100, Hewlett Packard – HP, EUA).

A separação do HA formado foi realizada no cromatógrafo a partir da injeção de 15 µL da solução de reação em coluna C18 (Eclipse XDB, Agilent) (4.6 x 150 mm; 5 µm) e monitorada por absorbância a 228 nm. A coluna foi eluída a uma taxa

de fluxo de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ com duas misturas de solvente: A (0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) em água) e B (0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) em acetonitrila), de acordo com o seguinte gradiente: 5-80% B em 15 min, mantendo por 5 min a 80% B, retornando para 5% B por 10 s, seguido por uma eluição isocrática a 5% B por 10 min

Para a construção da curva padrão foi utilizado uma solução padrão de ácido hipúrico (Sigma Aldrich) com concentrações entre 0,1 a $1,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

A inibição da ECA pela presença dos peptídeos foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = (\text{HA}_{\text{controle}} - \text{HA}_{\text{inibidor}} / \text{HA}_{\text{controle}}) \times 100\% \quad (2)$$

sendo:

$\text{HA}_{\text{controle}}$ = o valor de ácido hipúrico formado (expresso em μg) durante a reação da amostra controle (sem a presença dos hidrolisados como inibidores);

$\text{HA}_{\text{inibidor}}$ = o valor de ácido hipúrico formado (expresso em μg) durante a reação da amostra contendo os hidrolisados como inibidores.

Todas as amostras contendo os hidrolisados foram corrigidas pelo valor de HA formado na amostra do branco. Para a amostra controle foi colocado tampão borato como substituto da amostra com hidrolisado. Para a amostra do branco foram colocados $40 \mu\text{L}$ de tampão borato ao invés da adição da enzima juntamente com o substrato e o hidrolisado para descontar o HA formado durante a reação sem a presença da enzima.

3.7.3 Determinação da inibição da ECA com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH

O segundo método utilizado para avaliar a atividade inibitória da ECA foi baseado na técnica de Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência (FRET) desenvolvido por Carmona et al. (2006).

O substrato fluorogênico utilizado foi o Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH (simplificado para Abz-FRK(Dnp)-P-OH), sintetizado em fase sólida no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan e a enzima conversora da angiotensina foi preparada conforme descrito no item **3.7.1**.

Primeiramente, o substrato foi diluído em 100% DMSO (1 mg.mL^{-1}) e sua concentração foi determinada em espectrofotômetro a 365 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar do grupo Dnp ($\epsilon_{365} = 17.300 \text{ M.cm}^{-1}$ e PM: 831,89).

Um volume de 150 μL de tampão Tris-HCl 0.1 M (pH 7,0) contendo NaCl (50 mM) e ZnCl_2 (10 mM) foram transferidos para microplaca preta (3915, Corning) e adicionaram-se 5 μL de ECA (0,5 mU) e 5 μL de hidrolisado (ou 5 μL de tampão para amostra controle) em cada poço. A microplaca foi mantida sob agitação rápida e incubada a 37°C por 5 min. Após esse período, foram adicionados 5 μL de substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH, a uma concentração de 2 μM sob volume final. A emissão de fluorescência foi monitorada no leitor de fluorescência (Synergy H1, Biotek) durante 10 min a 37°C nos comprimentos de onda de 320 nm (excitação) e 420 nm (emissão).

A taxa de emissão de fluorescência foi determinada como unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (UAF.min^{-1}). O valor obtido do coeficiente angular da reta, que expressa a inclinação da reta e a velocidade da reação enzimática (em UAF.min^{-1}), foi adotado como 100% da atividade da enzima, representando, portanto, a amostra controle do ensaio.

Cada ensaio de inibição foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos a partir da média da triplicata. A porcentagem de inibição da ECA foi calculada pelas seguintes fórmulas:

$$\% \text{ atividade enzimática} = (\text{UAF. min}^{-1}_{\text{amostra}}) / \text{UAF. min}^{-1}_{\text{controle}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \% \text{ de atividade enzimática} \quad (4)$$

3.8 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO PEPTÍDICA EM RP- HPLC

O fracionamento e a purificação peptídica foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, em colaboração com o Dr. Daniel Carvalho Pimenta.

Aproximadamente 1 mL de hidrolisado total (10 mg.mL^{-1} de proteína) foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 40 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para as

etapas de fracionamento por HPLC em fase reversa (RP-HPLC) (Prominence 20A, Shimadzu Co., Japão).

Na primeira etapa de fracionamento do hidrolisado, foi utilizada uma coluna C18 (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m), utilizando dois solventes no sistema: A (0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água) e B (0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em acetonitrila). A coluna foi eluída a uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹ com um gradiente de 10 a 60% de B por 30 min, monitorada a absorbância em 214 nm. As frações foram coletadas em tubo manualmente a cada 5 min, totalizando cinco frações (F1 a F5), as quais foram liofilizadas e ressuspendidas em 100 μ L de água deionizada para o ensaio da atividade inibitória da ECA.

A fração (F3) com a maior atividade inibitória da ECA foi submetida a um novo fracionamento utilizando a mesma coluna da etapa descrita anteriormente. A eluição foi realizada de forma isocrática com 16% do solvente B com taxa de fluxo de 1,4 mL.min⁻¹ por 40 min, monitorada a absorbância em 214 nm. Nesta segunda etapa, as subfrações foram coletadas em tubo manualmente a cada 2,5 min, resultando em sete subfrações (3.1 a 3.7), as quais também foram liofilizadas e ressuspendidas em 100 μ L de água deionizada para o ensaio da atividade inibitória da ECA, como anteriormente.

As subfrações (3.2 e 3.4) que apresentaram a maior atividade de inibição da ECA foram submetidas à etapa de purificação. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 com base de carbono (Hypercarb, Thermo Scientific) (150 x 4,6 mm) eluída de forma isocrática com 14% do solvente B para a subfração 3.2 e 16% de solvente B para a subfração 3.4 com taxa de fluxo a 1 mL.min⁻¹ para ambas as frações, monitoradas a absorbância em 214 nm. De acordo com a forma de distribuição no cromatograma, foram coletados, ao total, oito picos da subfração 3.2 e dez picos da subfração 3.4. Cada pico coletado foi liofilizado, ressuspendido em 10 μ L de água, submetidos ao ensaio de inibição da ECA e, subsequente, ao sequenciamento por MS.

3.9 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

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 utilizando um espectrômetro do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF) (Shimadzu Co., Japão).

Os picos coletados (3.2.8 e 3.4.10) com maior atividade de inibição da ECA foram secos e ressuspensos em 0,5% de ácido fórmico em água para as análises no modo positivo, ou em metanol para as análises no modo negativo. Em seguida, as amostras foram inseridas diretamente no espectrômetro por injeção manual, em um injetor Rheodyne, a um fluxo de 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, sendo 25 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ de solução A (0,5% de ácido fórmico em água) e 25 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ de solução B (90% de acetonitrila em água contendo 0,5% de ácido fórmico) para as análises no modo positivo. Para o modo negativo, utilizaram-se 25 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ de solução A (água) e 25 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ de metanol. A voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e a voltagem do detector, 1,76 KV, com temperatura de 200°C, sendo a fragmentação causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia. Os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. Para o sequenciamento *de novo* de peptídeos, o íon de interesse foi selecionado em uma janela de massa de 0,5 m/z e fragmentado. O espectro gerado foi analisado pelo software *Peaks Mass Spectrometry* (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) e manualmente verificado para acuidade e correção.

3.10 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os cinco peptídeos (FLEK, GSGKHVSP, LDNK, MVVDKLF e MEKHS) identificados como potenciais peptídeos inibidores da ECA foram sintetizados pela empresa BIOMATIK (Estados Unidos). O grau de pureza de cada peptídeo sintetizado foi de 98% de acordo com as análises em HPLC e por MS.

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

Os ensaios de cinética enzimática para a determinação da IC_{50} (concentração de peptídeo inibidor necessária para inibição de 50% da atividade da ECA) e da constante de inibição (K_i) dos cinco peptídeos sintetizados (FLEK, GSGKHVSP, LDNK, MVVDKLF e MEKHS) foram realizados em fluorímetro de cubeta (SpectraMax,

Molecular Devices) a 37°C, adotando-se as seguintes condições: 1000 µL de Tris-HCl 0.1 M (pH 7,0) contendo NaCl (50 mM) e ZnCl₂ (10 mM) e 10 µL do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH (solução estoque de 1,37 mM) foram pré-incubados por 5 min. Posteriormente, adicionaram-se 5 µL de ECA (0,5 mU) e a velocidade da reação (expressa em AFU.min⁻¹) foi registrada após 5 min, sendo considerada como a velocidade de hidrólise do substrato pela ação da enzima na ausência do peptídeo inibidor (v_0). Após esse período, foram adicionadas cinco diferentes concentrações de cada peptídeo inibidor [I], sendo suas velocidades de inibição (v_i) registradas, novamente, após 5 min de reação.

A atividade de inibição da ECA foi calculada pela relação entre as velocidades na presença e na ausência de cada peptídeo inibidor conforme as equações 3 e 4, descritas anteriormente. O valor de IC₅₀ de cada peptídeo inibidor, ou seja, a concentração mínima necessária para inibir 50% da atividade da ECA, foi calculado pelo software *Grafit* (versão 3.0, Erithacus Software), assim como também foi utilizado o software para a construção das curvas semilogarítmicas de dose-reposta (atividade de inibição *versus* concentração de inibidor)

O valor da constante de inibição (K_i) de cada peptídeo inibidor foi calculado de acordo com o protocolo descrito por Beynon e Bons (2001) a partir da seguinte fórmula:

$$v_0 / v_i = 1 + [I] / K_{i(app)} \quad (5)$$

sendo:

v_0 = velocidade do ensaio controle (expressa em AFU.min⁻¹), ou seja, velocidade de hidrólise do substrato pela ação da ECA na ausência do peptídeo inibidor;

v_i = velocidade do ensaio enzimático na presença do inibidor (expressa em AFU.min⁻¹);

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

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

Após a obtenção dos valores de $K_{i(app)}$ para cada peptídeo inibidor em diferentes concentrações, os valores reais de K_i foram calculados a partir da seguinte fórmula:

$$K_i = k_{i(app)} / (1 + [S] / K_m) \quad (6)$$

sendo:

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

$[S]$ = concentração do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH utilizado no ensaio. Para esse ensaio, o substrato foi utilizado na concentração de $13,56 \mu\text{M}$;

K_m = constante de Michaelis, cujo valor é a concentração de substrato correspondente à metade da velocidade máxima ($V_{\max}$) da reação enzimática. O valor da K_m calculado pelo software *Grafit* (versão 3.0, *Erithacus Software*) correspondeu a $4 \mu\text{M}$, estando de acordo com o protocolo do método descrito por Carmona et al. (2006) e, anteriormente por Araujo et al. (2000).

Ao final, o valor de K_i de cada peptídeo inibidor (FLEK, GSGKHVSP, LDNK, MVVDKLF e MEKHS) foi calculado a partir da média dos cinco valores de K_i obtidos de cada concentração testada no ensaio de inibição.

3.12 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES SINTETIZADOS

O mecanismo de inibição da ECA na presença de cada peptídeo inibidor (FLEK, GSGKHVSP, LDNK, MVVDKLF e MEKHS) foi analisado a partir da equação de Lineweaver-Burk.

A cinética enzimática na ausência (ensaio controle) e na presença dos peptídeos inibidores foi realizada em fluorímetro de cubeta (SpectraMax, Molecular Devices) a 37°C , adotando-se as seguintes condições: $1000 \mu\text{L}$ de Tris-HCl 0.1 M (pH 7,0) contendo NaCl (50 mM) e ZnCl_2 (10 mM), $5 \mu\text{L}$ de ECA ($0,5 \text{ mU}$) e três diferentes concentrações de cada peptídeo inibidor em cada ensaio. Após incubação da enzima com cada peptídeo inibidor por 5 min , foram adicionadas seis diferentes concentrações do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH ($1,4$ a $21,5 \mu\text{M}$). A velocidade ($\text{AFU} \cdot \text{min}^{-1}$) da reação enzimática foi registrada após 5 min e os valores foram convertidos em $1/v$ e $1/[S]$.

A variação da K_m e da $V_{\max}$ em cada ensaio foi analisada pelo software *Grafit* (versão 3.0, *Erithacus Software*), assim como também a relação entre $1/v$ versus $1/[S]$ a partir da transformação da equação de Lineweaver-Burk para identificar o

mecanismo de inibição, na qual a inclinação da reta no gráfico representa K_m/V_{max} ; o intercepto do eixo $1/v$ (eixo y) representa $1/V_{max}$ e o intercepto do eixo $1/[S]$ (eixo x) representa $-1/K_m$. A partir desses resultados, cada peptídeo inibidor foi classificado quanto ao modo de inibição como: competitivo, acompetitivo, não-competitivo ou misto.

3.13 ESTABILIDADE DOS PEPTÍDEOS PELA AÇÃO DA ECA

A estabilidade de cada peptídeo inibidor pela ação da ECA foi avaliada na própria presença dessa enzima. Neste ensaio, 10 μ L de cada peptídeo inibidor foram incubados com a ECA (5 μ L) em 1000 mL de tampão Tris-HCl 0.1 M (pH 7,0) contendo NaCl (50 mM) e $ZnCl_2$ (10 mM) por 60 min à 37 °C e a reação foi interrompida após serem armazenados a -20°C. Avaliou-se a estabilidade dos peptídeos comparando seus cromatogramas antes e após incubação com a ECA por LC-MS.

3.14 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os ensaios da atividade inibitória da ECA foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

As diferenças entre as médias da atividade inibitória da ECA em relação aos diferentes tempos de hidrólise foram analisadas utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Como forma de melhor caracterizar as sementes de cupuaçu, sua composição centesimal foi determinada, sendo os dados expressos em base seca, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Composição centesimal da semente fresca de cupuaçu expresso em porcentagem (base seca).

Componentes	Fresca
Proteínas	9,09 ± 0,67
Lipídeos	61,89 ± 0,58
Carboidratos (por fração):	
Açúcares Totais	3,03
Amido	6,59 ± 1,10
Fibra alimentar	11,24
Cinzas	2,91 ± 0,05

De acordo com os resultados obtidos pelo método de Kjeldahl, verificou-se que a semente fresca de cupuaçu apresenta teor proteico (9%) bastante relevante, sendo ligeiramente inferior quando comparado ao teor já relatado na semente fresca do cacau (~15) (EFRAIM et al, 2010; MATTIETO, 2001), tendo em vista que ambas as sementes apresentam características proteicas similares (REISDORFF et al., 2004). Considerando que as sementes foram provenientes do cupuaçu Redondo, verificou-se que o teor de proteína está próximo ao valor encontrado em sementes da mesma variedade do fruto de outra localidade e período de colheita (CARVALHO et al. 2005, LOPES, 2000), sugerindo que as condições no plantio e safra não se refletiram no teor proteico das sementes frescas. Em comparação a nozes e outras sementes comestíveis, verificou-se que o teor proteico da semente de cupuaçu é similar ao da macadâmia (8,4%), mas não supera os valores encontrados na castanha-do-pará (14%), castanha-de-caju (18%), amendoim (24%), avelã (14%)

(FREITAS e NAVES, 2010; VENKATACHALAM e SATHE, 2006) e semente de baru (29%) (SOUSA et al., 2011)

Os lipídeos responderam pelo maior percentual da composição das sementes e estão próximos a teores relatados em outros estudos (VASCONCELOS, 1999 e MATTIETO, 2001), e acima dos valores encontrados na semente de cacau torrada (~50%) (COHEN et al., 2004; MATTIETO (2001), o que justifica o crescente interesse pelo uso desse componente da semente em diversas aplicações mas, principalmente, como substituinte da manteiga do cacau (ESCRIVÁ, 2002).

As sementes frescas apresentaram um teor elevado de fibras quando comparado a outros estudos que obtiveram valores próximos a 4% (CARVALHO et al. 2005; LOPES, 2000), diferença que pode ser atribuída à metodologia utilizada. Por outro lado, os valores encontrados foram bastante similares aos do amendoim (11%), avelã (12%) e amêndoas de baru (13%).

Verificou-se um teor inicial de aproximadamente 20% de carboidratos nas sementes frescas, sendo fibras e amido os elementos que mais contribuíram nesses percentuais de carboidratos. Nesse caso, observou-se que os açúcares solúveis compõem a menor parte dos carboidratos, sendo a sacarose o açúcar predominante com 1,3%, seguido de 0,46% de glicose e 0,33% de frutose. Os teores de açúcares solúveis na semente de cupuaçu fresca foram comparáveis aos da semente de cacau que apresentaram 1,54% de sacarose, 0,59% de glicose e 0,56% de frutose (MATTIETO, 2001), indicando a semelhança entre para ambas as sementes. Nesse contexto, sabe-se que durante a etapa de fermentação, e, principalmente, na torração, há a redução dos açúcares totais, uma vez que ocorre a quebra da sacarose pelas invertases, sendo os açúcares redutores consumidos na reação de Maillard. Essa é uma das alterações físico-químicas essenciais para o desenvolvimento dos precursores do aroma da semente de cupuaçu e que se assemelha ao aroma do cacau.

4.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DA SEMENTE FRESCA DE CUPUAÇU

Isolados proteicos de sementes e grãos são definidos como produtos contendo quase a totalidade da fração proteica, sendo removida a maior parte dos componentes não proteicos (SMITH e CIRCLE, 1972). Nesse sentido, a obtenção do isolado proteico da semente fresca consistiu inicialmente na remoção dos lipídeos que constitui a maior fração na sua composição nutricional, seguido da remoção parcial dos alcaloides e dos compostos fenólicos, sendo esses os principais metabólitos secundários presentes na semente. Embora a concentração de alcaloides nas sementes de cupuaçu seja baixa (~1,5 mg/g) (COCO et al., 2007), a minimização da presença desses compostos antes da obtenção do isolado proteico da semente fresca foi essencial, uma vez que os alcaloides contêm nitrogênio em sua molécula e poderiam interferir no teor proteico quando estimado pelo método de Kjeldahl. Já a remoção parcial dos compostos fenólicos antes da obtenção dos isolados proteicos da semente fresca foi essencial para evitar a interação com as proteínas, o que poderia interferir no ensaio da atividade de inibição da ECA, pois diversos estudos têm evidenciado que, além dos peptídeos, os compostos fenólicos, incluindo as diversas subclasses dos flavonoides, também são capazes de inibir *in vitro* a ação da ECA (GORETTA et al., 2003; GORETTA et al., 2006; OTTAVIANI et al., 2006). Diante disso, a remoção desses compostos foi fundamental para que a avaliação de inibição da ECA pudesse ser estimada em relação aos eventuais peptídeos bioativos, como estabelece a hipótese inicial deste trabalho.

O isolado proteico da semente fresca de cupuaçu foi obtido no pH do ponto isoelétrico das proteínas, de acordo com o descrito por Carvalho et al. (2009). Verificou-se um aumento de 25 para 88% do teor proteico da farinha desengordurada após a obtenção em isolado proteico. Em relação à massa inicial da farinha desengordurada submetida à remoção parcial de alcaloides e compostos fenólicos, o processo de obtenção do isolado proteico indicou um rendimento de 11%. Carvalho et al. (2009) relataram teores de proteínas na farinha desengordurada de cupuaçu e no seu isolado proteico de aproximadamente 27,6 e 64,3%, respectivamente, e um rendimento de 14,84%. Com exceção dos valores proteicos da farinha desengordurada, o elevado teor proteico do isolado da semente

fresca de cupuaçu obtido neste trabalho pode ser atribuído, provavelmente, à eficiente remoção dos metabólitos secundários da semente, promovendo uma melhor recuperação das proteínas durante a precipitação no seu pH do ponto isoelétrico.

Os valores de proteína para o isolado proteico da semente fresca de cupuaçu foram comparáveis aos de isolados pouco utilizados, mas que constituem uma alternativa potencial de utilização tecnológica, como o isolado da castanha do Pará (81,6%) (GLÓRIA e REGITANO-D'ARCE, 2000), o isolado proteico do grão de bico (88%) (SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 1999) e ao do amendoim (88,5%) (JAMDAR et al., 2010), revelando o grande potencial da semente fresca de cupuaçu para a sua utilização na indústria de alimentos, ainda que esses valores sejam inferiores aos de isolados comerciais como da soja (95,1%) (LUI et al., 2003) e do soro de leite (90,8%) (ROMAN e SGARBIERI, 2007), que são bastante utilizados como ingredientes na indústria de alimentos devido às suas excelentes propriedades nutritivas bem como suas propriedades físico-químicas e funcionais. Nesse sentido, o isolado proteico da semente fresca de cupuaçu apresenta importantes propriedades funcionais, como uma alta solubilidade e capacidade emulsificante (CARVALHO et al., 2005), sugerindo que embora o teor proteico seja inferior aos isolados de referência, exibem boas características para aplicação industrial.

4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Para uma melhor caracterização do isolado proteico obtido da semente fresca de cupuaçu, foi determinada sua composição de aminoácidos, sendo o perfil aminoacídico apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Composição de aminoácidos do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu.

Aminoácido	g/100g*
Ácido Aspártico	11,91 ± 0,03
Ácido Glutâmico	12,19 ± 0,07
Serina	5,05 ± 0,10
Glicina	4,61 ± 0,05
Histidina	0,98 ± 0,03
Arginina	6,13 ± 0,05
Treonina	4,78 ± 0,05
Alanina	3,10 ± 0,00
Prolina	3,63 ± 0,01
Tirosina	4,09 ± 0,06
Valina	5,30 ± 0,02
Metionina	2,10 ± 0,30
Cisteína	1,86 ± 0,02
Isoleucina	3,91 ± 0,03
Leucina	6,50 ± 0,04
Fenilalanina	3,59 ± 0,02
Triptofano	2,78 ± 0,01
Lisina	5,70 ± 0,05

*Os valores correspondem a média ± desvio padrão (n=3).

Observou-se que o ácido aspártico, o ácido glutâmico e a leucina apresentam-se em maiores teores quando comparados aos demais aminoácidos, representando aproximadamente 30% do teor total. Por outro lado, a histidina foi o único aminoácido encontrado com menos de 1%. Esse mesmo perfil foi verificado em outros estudos realizados tanto para a semente fresca de cupuaçu como de seu isolado (CARVALHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2008), sugerindo que o processo de obtenção do isolado não resultou em perdas significativas desses aminoácidos como, também, daqueles aminoácidos em menores teores. A análise

também revelou que os aminoácidos hidrofóbicos representam ~31% do total proteico, destacando-se a leucina e a valina em maiores proporções. Esse percentual aminoacídico hidrofóbico é bastante similar ao encontrado na semente de baru (33%) e na semente de pequi (34%) (SOUZA et al., 2011), nas amêndoas (32%), na macadâmia (31%) e no pinhão (33%), mas não superam os percentuais encontrados na castanha-de-caju (36%) e na castanha-do-pará (39%) (VENKATACHALAN e SATHE, 2006).

Diversos estudos têm sugerido que a presença de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada) nas sequências peptídicas pode contribuir para o aumento da atividade inibitória da ECA. Nesse sentido, diversas fontes proteicas têm sido digeridas com a enzima Alcalase, uma vez que sua especificidade é por aminoácidos hidrofóbicos e os peptídeos liberados que apresentam aminoácidos hidrofóbicos na posição C-terminal tem sido revelados como potentes inibidores da ECA. A semente de amaranto, por exemplo, apresentou na sua composição aminoacídica 30% de aminoácidos hidrofóbicos, sem grandes perdas desse percentual após a hidrólise pela ação da Alcalase, sendo esses hidrolisados potentes inibidores da ECA (TIENGO et al., 2009). Da mesma forma, as proteínas do farelo de canola apresentaram 33% de aminoácidos hidrofóbicos que ao serem digeridas pela Alcalase liberaram peptídeos com alta atividade inibitória da ECA (WU et al., 2008). Também o hidrolisado obtido após digestão das proteínas de soja pela ação da Alcalase apresentou um perfil aminoacídico muito semelhante às proteínas da soja, indicando que a hidrólise enzimática foi capaz de preservar a qualidade nutritiva dessas proteínas, e, além disso, esse hidrolisado apresentou dois peptídeos hidrofóbicos com atividade inibitória da ECA, ressaltando a contribuição da especificidade da enzima no alcance desse resultado (WU et al., 2002). Nesse sentido, esses resultados sugerem que sementes que apresentam em sua composição proteica em torno de 30% de aminoácidos hidrofóbicos quando digeridas com Alcalase podem gerar potentes peptídeos inibidores da ECA. Sendo assim, o percentual de aminoácidos hidrofóbicos do isolado proteico da semente de cupuaçu pode ser considerado promissor quanto às proteínas serem fontes de peptídeos bioativos quando digeridas pela Alcalase.

4.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

O isolado proteico da semente fresca de cupuaçu foi submetido à hidrólise enzimática pela ação da Alcalase, sendo o ensaio monitorado por meio da determinação do grau de hidrólise (em inglês, Degree of Hydrolysis - DH) durante 8 h de reação (**Figura 6**). De uma maneira geral, as seis replicatas do ensaio de hidrólise realizadas apresentaram boa reprodutibilidade, apontando confiabilidade nos resultados.

Figura 6 - Evolução do grau de hidrólise do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu pela ação da Alcalase em função do tempo de hidrólise. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis ensaios (n=16). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p < 0,05$)

Observou-se um aumento significativo no valor do DH em 1 h, atingindo um patamar máximo após 2 h de reação. A partir desse tempo, a curva permaneceu constante até 8 h de ensaio, representando o valor máximo atingido no grau de hidrólise do isolado proteico. Sendo assim, houve aumento de aproximadamente 16 a 20% no grau de hidrólise entre a primeira e a oitava hora de ensaio.

Verificou-se que o tempo de hidrólise para alcançar o valor máximo de DH (20%) foi similar aquele para alcançar o mesmo grau de hidrólise em isolado proteico de amendoim pela ação da Alcalase na concentração do substrato a 10% (JAMDAR et al., 2010) e foi maior ao valor do DH (aproximadamente 10%) alcançado após 8 h de hidrólise do isolado proteico do salmão também pela ação da

Alcalase na concentração de substrato a 12% (AHN et al., 2012), revelando que a capacidade hidrolítica da enzima é influenciada não somente pelos parâmetros hidrolíticos estabelecidos no ensaio, mas também pela características de cada fonte proteica. Por outro lado, o DH do isolado proteico da semente de cupuaçu foi inferior aos valores de DH das proteínas de duas espécies de feijão *Phaseolus lunatus* e *Phaseolus vulgaris*, quando digeridas com Alcalase em 60 min, resultando em valores em torno de 35% e 45%, respectivamente. Essa diferença pode estar relacionada ao teor de aminoácidos hidrofóbicos, uma vez que ambas as espécies de feijão exibiram altos teores de aminoácidos hidrofóbicos, principalmente valina, leucina e fenilalanina, que favorecem a hidrólise com Alcalase (UCO et al., 2009).

O grau de hidrólise é um dos parâmetros importantes na obtenção de hidrolisados contendo peptídeos capazes de inibir a ação da ECA, uma vez que hidrólise extensa (DH>10%) é positiva na formação de peptídeos com baixa massa molecular (ADLER-NISSEN, 1986), sendo, portanto, mais favoráveis à atividade de inibição da ECA. Na hidrólise do concentrado proteico do amaranto pela ação da Alcalase, o valor de DH foi de 16% e o hidrolisado obtido apresentou atividade inibitória da ECA (TIENGO et al., 2009), assim como hidrolisados da proteína do soro do leite com valor de DH de 14% também apresentaram efeito inibidor sob a ECA (ADJONU et al., 2013). Assim os valores de DH alcançados da hidrólise proteica dos isolados da semente fresca de cupuaçu podem ser considerados favoráveis à obtenção de peptídeos bioativos em questão. Além disso, observou-se que 2 h de reação enzimática foram suficientes para alcançar o valor máximo de DH e, muito provavelmente, esse é o tempo necessário na obtenção do hidrolisado com formação de peptídeos bioativos. Por esse motivo, a relação do grau de hidrólise e a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu também foi avaliada, conforme descrito no item 4.7.

4.5 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE DE CUPUAÇU E DOS HIDROLISADOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA ALCALASE

O perfil eletroforético das proteínas referentes à semente fresca de cupuaçu desengordurada, ao isolado proteico e aos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase em 2, 4 e 8h de ensaio estão apresentados na **Figura 7**.

Figura 7 – 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) farinha seca e desengordurada da semente fresca de cupuaçu; (3) isolado proteico obtido da semente fresca de cupuaçu; (4) hidrolisado obtido pela ação da Alcalase em 2h de ensaio; (5) hidrolisado obtido pela ação da Alcalase em 4h de ensaio; (6) hidrolisado obtido pela ação da Alcalase em 8h de ensaio. Foram aplicadas 20 µg de proteína por poço para todas as amostras. Foram utilizados 5 µL do padrão de massa molecular. À direita estão indicadas as posições aproximadas da banda da globulina e albumina.

Como pode ser notado, foram coradas bandas intensas na semente fresca desengordurada com pesos moleculares entre 20 a 40 kDa e outras bandas adicionais mais fracas com pesos moleculares em até aproximadamente 200 kDa. Diversos estudos já revelaram que o perfil proteico das sementes de cupuaçu é bastante similar as do cacau, sendo caracterizado pela predominância das frações albumina e globulina, sendo esta a principal proteína de reserva de ambas as sementes (VOIGT et al., 1993). As globulinas se caracterizam por dois polipeptídeos predominantes, com pesos moleculares de aproximadamente 31 e 47 kDa, enquanto as albuminas se caracterizam por pelo menos um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 21 kDa (VOIGT et al., 1993). Desse modo, o perfil da semente fresca desengordurada encontrado neste trabalho é bastante semelhante aos perfis já mostrados na literatura para o cacau e para o cupuaçu (REISDORFF et al., 2004; LERCETEAU et al., 1999). Ressalta-se que Carvalho et al. (2009) também evidenciou uma banda intensa em 40 kDa na semente de cupuaçu, e sendo,

portanto, muito provavelmente a banda de 43 kDa que parece corresponder ao polipeptídeo de 47 kDa da fração globulina no cacau (VOIGT et al., 1993)

No perfil do isolado proteico, os resultados indicaram a forte predominância da banda de aproximadamente 20 kDa e mais oito bandas de menor intensidade quando comparado a semente fresca desengordurada. A ausência das demais bandas que eram evidentes antes da obtenção do isolado sugere que houve perda proteica durante esse processo, o que pode ser atribuído, principalmente, às várias etapas de lavagem para a remoção dos compostos fenólicos.

Já no perfil dos hidrolisados, observou-se a total perda das bandas de 180, 55, 38, 30 e 27 kDa, acompanhada do aumento da intensidade das bandas abaixo de 15 kDa nos três tempos de hidrólise, correspondendo a peptídeos de baixa massa molecular. Além disso, não foram observadas bandas adicionais de menor massa molecular após hidrólise mais longa (4 e 8h de reação), indicando que as proteínas do isolado foram hidrolisadas rapidamente e de forma eficiente já nas duas primeiras horas de reação enzimática. Por outro lado, mesmo após a hidrólise por 8 h, persistiu a banda de 20 kDa, correspondente a fração albumina, o que pode ser atribuído ao fato desse polipeptídeo ser um inibidor de tripsina (inibidor de tripsina tipo-Kunitz) e já foi mostrado que essa fração resiste até mesmo ao processo de fermentação da semente (LERCETEAU et al., 1999).

Com base nesses resultados, é possível afirmar que o processo de hidrólise no isolado proteico pela ação da Alcalase promoveu a formação de novos peptídeos de baixa massa molecular a partir das globulinas e resistência à hidrólise das albuminas, como era esperado. De qualquer modo, a análise *in silico* realizada no banco de dados BIOPEP em relação às proteínas do cacau indicou que os possíveis fragmentos peptídicos gerados como inibidores da ECA são provenientes das globulinas. Sendo assim, fica claro que o perfil eletroforético observado indica que os hidrolisados foram produzidos por diferentes bandas proteicas, incluindo a fração globulina das proteínas do isolado, e de que são grandes as chances de que esses hidrolisados possam apresentar peptídeos com atividade de inibição da ECA.

4.6 ENSAIO DE DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ECA COM O SUBSTRATO HHL

De modo a melhor definir as condições de ensaio da atividade de inibição da ECA utilizando o substrato HHL, os primeiros testes feitos no HPLC tiveram como objetivo confirmar a formação do ácido hipúrico (HA) que é o produto formado da reação da ECA com o substrato HHL. Para isso, uma solução padrão de HA foi injetada no cromatógrafo e o tempo de retenção encontrado foi de aproximadamente 7,9 min.

As condições cromatográficas estabelecidas para esse ensaio permitiram uma boa separação do substrato HHL e do produto HA, conforme adaptado do método descrito por Lahogue et al. (2010) baseado dos originais Cushman e Cheung (1971) e Wu et al. (2002). Os tempos de retenção do HHL e do HA foram de 9,1 e 7,9 min (**Figura 8**), respectivamente, e não foram observados outros picos interferentes nesses tempos de retenção.

Figura 8 – Cromatograma de eluição do substrato (HHL) e do produto (HA) após reação enzimática nas condições cromatográficas estabelecidas com tempos de retenção de 9,1 e 7,9 min, respectivamente.

A partir da determinação das condições cromatográficas de separação do produto e do substrato da ECA, iniciou-se a padronização do método com a construção da curva de calibração de HA. Para a determinação e avaliação de linearidade da curva de ácido hipúrico (HA) foram injetados diferentes volumes a partir de uma solução padrão de HA (0,05 µg/µL) no sistema cromatográfico. Sendo assim, os valores da curva variaram entre 0,1 a 1 µg de HA e foram relacionados, respectivamente, com suas áreas de pico detectadas no cromatógrafo (**Figura 9**). A curva obtida apresentou um coeficiente de regressão (R^2) igual a 1, indicando uma linearidade satisfatória para a sua utilização no ensaio de atividade inibitória da ECA.

Figura 9 - Curva padrão de ácido hipúrico (HA) determinada a partir da relação entre diferentes valores de massa de HA (expresso em µg) com as suas respectivas áreas de picos detectados no cromatógrafo.

A partir dessa etapa, foram realizados os primeiros testes da reação enzimática da ECA sobre o HHL. É importante ressaltar que para a realização dos testes do ensaio da ECA, inicialmente sem a presença do hidrolisado, foram utilizadas quantidades de enzima (1mU), volume de substrato (100 µL) e tampão substituindo o hidrolisado (25 µL) em 30 min de incubação, de acordo com o método de Lahogue et al. (2010).

Como controle positivo de ação enzimática foi feito o ensaio com a presença apenas da enzima e do substrato para a obtenção do produto. Isso é essencial para confirmar a atuação da enzima nas condições de pH, tempo e temperatura

estabelecidas no ensaio, de modo que uma eventual inibição causada pelos extratos de cupuaçu possa ser detectada. A **Figura 10** mostra o aumento da quantidade de ácido hipúrico formado durante 60 min de reação da enzima conversora da angiotensina na presença do substrato HHL. O aumento no teor de HA indicou que a enzima exerceu sua atividade na presença do substrato nas condições de pH, tempo e temperatura empregadas, como esperado.

Figura 10 - Produção de ácido hipúrico (HA) a partir da reação da enzima conversora da angiotensina (1mU) com Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) em função do tempo de incubação.

Por outro lado, também foi essencial saber se houve a formação de produto HA de forma independente da ação da enzima durante a reação, ou seja, que pudesse ser formado da decomposição de substrato. Portanto, foi realizado um segundo ensaio com a presença apenas de substrato HHL e da solução tampão, sem a presença da enzima. Nesse caso, não foi detectado nenhum pico de ácido hipúrico, permitindo concluir que a formação de HA foi proveniente somente da reação enzimática com o substrato.

Nesse tipo de ensaio, a estimativa da atividade inibitória da ECA é baseada na comparação do valor da área do pico de HA formado a partir da reação enzimática da amostra controle e da área do pico de HA formado pela ação da enzima com o substrato na presença do hidrolisado. Esse hidrolisado é considerado como a solução potencialmente inibidora e, por isso, foi importante verificar se não

apresentava nenhum composto com o mesmo tempo de retenção do HA, pois isso poderia levar a uma superestimativa do valor da área do pico de produto e, portanto, interferir no cálculo do percentual final de inibição da ECA. Assim, para verificar a ocorrência de algum interferente com o mesmo tempo de retenção cromatográfico do HA pelo hidrolisado proteico, alíquotas de 25 μL dos hidrolisados obtidos em diferentes tempos de hidrólise (0, 1, 2, 4, 6 e 8 h) foram incubados com 110 μL de solução tampão, substituindo o volume total de substrato e de enzima, e a reação foi interrompida com 100 μL de HCl 1M após 30 min. Os hidrolisados obtidos nos diferentes tempos de hidrólise apresentaram em seus cromatogramas um pico com o mesmo tempo de retenção (7,9 min) do ácido hipúrico (HA), como ilustrado na **Figura 11**, com exceção do extrato não-hidrolisado (0 h) que não apresentou nenhum pico.

Figura 11 – Cromatograma de eluição do pico detectado com tempo de retenção 7,9 min referente ao hidrolisado obtido em 1 h de hidrólise a partir do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu.

Esses resultados revelaram que a hidrólise do isolado proteico promoveu o surgimento de um pico de eluição no mesmo tempo de retenção, sendo um importante interferente a ser considerado no cálculo de inibição da ECA. Para uma avaliação mais conclusiva, foi adicionada uma quantidade conhecida de solução padrão de HA nas amostras contendo somente os hidrolisados a fim de se verificar a sobreposição dos picos da solução padrão de HA com o pico presente nos cromatogramas dos hidrolisados no tempo de retenção 7,9 min. Esse teste revelou a

sobreposição de ambos os picos avaliados, como exemplificado na **Figura 12**, e que, portanto, seria necessário subtrair o valor da área desse composto presente nos hidrolisados no cálculo da atividade de inibição da ECA. Sendo assim, nos primeiros ensaios a amostra contendo apenas os hidrolisados e o substrato HHL, sem a presença da ECA, foi considerada como o branco da amostra no cálculo de inibição (descrito no item **3.7.2**). É importante ressaltar que, no entanto, à medida que os hidrolisados foram diluídos para avaliar a perda do efeito inibidor, o pico interferente também diminuiu, não sendo mais considerado no cálculo.

Figura 12 – Cromatograma de eluição dos picos detectados com tempos de retenção 7,9 min referentes ao hidrolisado obtido em 1 h de hidrólise a partir do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu antes e após adição de solução padrão de ácido hipúrico (HA).

Para esses testes iniciais de detecção da atividade da ECA foi utilizada 1 mU de enzima, conforme descrito por Lahogue et al. (2010), cuja área do pico de HA formado a partir da reação enzimática corresponde a um valor de $815,5 \pm 0,17$, ou, mais especificamente, 0,16 μg de HA (**Figura 13**), representando o valor de produto formado da amostra controle da ação enzimática. No entanto, o composto detectado nos cromatogramas dos hidrolisados obtidos após 1, 2, 4, 6, e 8 h com o mesmo tempo de retenção do HA apresentou uma área de pico de aproximadamente 825,5. Como esses valores de áreas entre a amostra controle e amostra do branco foram muito próximos, haveria maior interferência para detectar uma provável inibição da ECA pelos hidrolisados. Sendo assim, adaptou-se o método utilizando 4mU de ECA

nos ensaios, tanto para a amostra controle como para os ensaios de inibição da enzima na presença dos hidrolisados, pois a área verificada empregando essa quantidade de enzima (**Figura 13**) permitindo sensibilidade maior de detecção para o cálculo final de inibição entre os valores de HA formado da amostra controle, do branco e da amostra com os hidrolisados. Todos esses testes foram essenciais para definir o ensaio da atividade inibitória da ECA por meio da detecção do HA por HPLC.

Figura 13 - Perfil da formação de ácido hipúrico (HA) (µg) em função do aumento da quantidade de enzima conversora da angiotensina expressa em mU. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3)

4.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA UTILIZANDO O SUBSTRATO HHL

Os primeiros ensaios da atividade inibitória da ECA foram realizados com o hidrolisado ultrafiltrado em membrana de exclusão molecular ≤ 3 kDa e a atividade de inibição foi avaliada para os produtos da digestão após 2, 4 e 8 h de hidrólise.

Posteriormente, as reações foram submetidas à separação cromatográfica para quantificação de HA formado e para o cálculo da atividade inibitória da ECA. Os resultados, expressos em porcentagem de inibição, estão apresentados na **Figura 14**.

Figura 14 - Perfil de inibição da ECA, expressa em porcentagem, em função do tempo de hidrólise 0, 2, 4 e 8 h do isolado proteico da semente fresca de cupuaçu pela ação da Alcalase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de um ensaio experimental ($n=3$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$)

Foi observado que os hidrolisados obtidos entre 2 h e 8h de digestão com Alcalase tiveram a capacidade de inibir a ação da ECA em valores superiores a 95%, enquanto o isolado não-hidrolisado (tempo 0 h) apresentou inibição da ECA em torno de 20%, indicando que existe uma capacidade inicial de inibição e que a hidrólise proporcionou um aumento desse efeito inibidor. A importância da hidrólise para o aumento da atividade de inibição da ECA no isolado proteico da semente fresca fica ainda mais evidente quando comparado ao isolado proteico de amendoim, pois os isolados não-hidrolisados apresentaram altos valores de inibição da ECA, em torno de 66%, ao passo que os hidrolisados apresentaram entre 90 e 97% (JAMDAR et al., 2010), mostrando um efeito menos marcante na atividade de inibição.

Além disso, esses resultados são coerentes com o perfil do grau de hidrólise encontrado, uma vez o valor máximo no DH alcançado foi em 2 h de ensaio, permanecendo constante mesmo após uma digestão mais longa. Nesse sentido, foi observado um perfil semelhante de inibição da ECA entre os tempos 2, 4 e 8 h de hidrólise, revelando que duas horas de hidrólise enzimática foram suficientes para a obtenção de hidrolisado com efeito inibidor sobre a ECA sem aumento frente ao tempo adicional de ensaio. Ao mesmo tempo, também não houve diminuição do efeito inibidor em razão do maior tempo de hidrólise, sugerindo que os peptídeos

com características de inibir a ação da ECA foram formados logo no início da digestão e mantendo o efeito inibidor ao longo do ensaio. Isso é importante, pois no isolado proteico de feijão, por exemplo, foi verificado o máximo de inibição da ECA (76,42%) após duas horas de hidrólise pela ação da Alcalase e observou-se uma queda para 52,66% de inibição após 10 h de digestão (LI et al., 2005). Neste caso, a extensão da hidrólise resultante da digestão mais prolongada provocou a perda da estrutura dos peptídeos, e consequentemente, a atividade inibitória.

Por outro lado, embora essa avaliação prévia do potencial inibitório tenha sido positiva, os altos valores de inibição poderiam indicar apenas a saturação da enzima pela presença dos hidrolisados em concentração mais alta, não havendo, de fato, uma inibição real. Nesse sentido, foi feita uma avaliação com base na relação entre diferentes fatores de diluição dos hidrolisados obtidos após 2, 4 e 8 h de ensaio e o efeito inibidor sobre a ECA, assim como a diferença dessa inibição entre 2 e 8h de hidrólise (**Figura 15**).

Figura 15 – Efeito inibitório de diferentes diluições dos hidrolisados obtidos em 2, 4 e 8 h sobre a ECA (%). Os pontos representam inibição da ECA nos diferentes tempos de hidrólise (%) e as barras representam a diferença de inibição da ECA entre 2 e 8 h (%). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de dois ensaios experimentais (n=4).

Observou-se que a atividade de inibição da ECA diminuiu à medida que o fator de diluição aumentou, o que evidencia a ação inibidora sobre a ECA pelos hidrolisados no ensaio de reação. Desse modo, verificou-se decréscimo de 10% na atividade de inibição da ECA nos hidrolisados diluídos 25 vezes em relação aos não-diluídos (mostrados na **figura 14**), revelando alta atividade inibitória, pois

concentrações mais baixas do hidrolisado ≤ 3 kDa, ainda assim, apresentaram efeito inibidor. Além disso, observou-se que a contribuição desse efeito inibidor na hidrólise mais extensa (8h) é muito pouca em relação a inibição da enzima obtido pelo hidrolisado em 2 h, indicando novamente esse o tempo suficiente para a formação de peptídeos ativos.

4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA UTILIZANDO O SUBSTRATO ABZ-FRK(Dnp)-P-OH

Um segundo método para avaliar a atividade inibitória da ECA foi testado, utilizando o substrato fluorogênico Abz-FRK(Dnp)-P-OH. Desse modo, foram conduzidos testes preliminares para otimização e aplicação do método de fluorescência para o ensaio de inibição. Primeiramente, foi analisada a linearidade da reação enzimática, visando utilizar condições de relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração do substrato. Assim, foi verificado o perfil de fluorescência, medida em Unidades Arbitrárias de Fluorescência por minuto (AFU.min⁻¹), em relação a diferentes concentrações de substrato (1 a 8 μ M) quando incubado com a ECA e medindo-se a taxa de fluorescência emitida durante 10 min de reação (**Figura 16**).

Figura 16 - Emissão de fluorescência, medida em unidades arbitrárias de fluorescência por min (AFU.min⁻¹), a partir da reação da enzima conversora da angiotensina (0,5mU) com diferentes concentrações do substrato fluorogênico Abz-FRK(Dnp)-P-OH após 10 min de reação.

A curva obtida apresentou um coeficiente de regressão (R^2) no valor 0,99, indicando linearidade de reação enzimática satisfatória para a sua utilização no ensaio de atividade inibitória da ECA. Além disso, foi verificado que 2 μ M de substrato é a concentração mínima que permite obter valores de fluorescência confiáveis para o ensaio, uma vez que concentrações menores podem resultar apenas em emissão de ruído de fundo (*background*) do próprio equipamento utilizado.

Com base nos resultados encontrados pelo método com o substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH na presença dos hidrolisados, foi observado que o isolado não-hidrolisado apresentou inibição da ECA em torno de 20% e os hidrolisados obtidos após 2, 4 e 8 h de hidrólise a partir da ação da Alcalase apresentaram valores de inibição da ECA acima de 80% (**Figura 17**), confirmando a observação anterior com o ensaio utilizando o substrato HHL e o produto detectado por HPLC. Além disso, verificou-se que não houve aumento do efeito inibidor frente ao aumento do tempo de reação de hidrólise confirmando que, de fato, duas horas de digestão é tempo suficiente para gerar hidrolisados com atividade de inibição da ECA, como também observado no ensaio utilizando o substrato HHL.

Figura 17 - Perfil de inibição da ECA (expressa em %) pelo método de fluorescência, em função dos tempos de hidrólise 0, 2, 4 e 8h do isolado proteico da semente de cupuaçu fresca pela ação da Alcalase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três ensaios experimentais ($n=9$). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p<0,05$)

Os ensaios da atividade de inibição da ECA por dois métodos amplamente conhecidos, sendo ambos bastante aplicados, de acordo com os dados na literatura, indicaram que os hidrolisados obtidos do isolado proteico da semente de cupuaçu a partir da ação da Alcalase apresentaram efeito inibidor com valores de atividade inibitória bastante similares. Vale ressaltar que o método testado para avaliar a inibição utilizando o substrato fluorogênico apresenta vantagens como: rapidez e sensibilidade, quando comparado ao método testado por HPLC com o substrato HHL e, portanto, foi o método escolhido para ser utilizado nas próximas etapas de avaliação de inibição da ECA. Além disso, o hidrolisado obtido após 2 h de ação da Alcalase foi selecionado para as etapas seguintes de estudo, uma vez que foi esse o tempo mínimo de reação em que o perfil de inibição da ECA foi alcançado.

Visando a caracterização dos peptídeos presentes no hidrolisado, foi feita uma separação cromatográfica preliminar desse material. Nesse contexto, o perfil cromatográfico do hidrolisado ≤ 3 kDa (dados não mostrados) indicou a presença de quase 70 picos, nenhum deles majoritários e com intensidade de UV muito baixa, apontando para a dificuldade na etapa de purificação dos peptídeos, exigindo a utilização de muito mais material para ser hidrolisado, e ainda, assim, podendo não ser o suficiente para isolar aqueles com o efeito biológico desejado. Por essa razão, estabeleceu-se uma nova estratégia de análise para investigar e identificar os peptídeos bioativos do material hidrolisado. Ao invés de se realizar a ultrafiltração e isolar os peptídeos de baixo molecular para, posteriormente, detectar a atividade de inibição, optou-se por realizar um ensaio biomonitorado, no qual seria feito o fracionamento peptídico diretamente do hidrolisado, sem a etapa de ultrafiltração, e seriam isoladas as frações com maior atividade biológica até a etapa de purificação e identificação dos peptídeos de interesse. A vantagem dessa estratégia, baseada somente nas frações com atividade biológica, é que a complexidade de amostra a ser analisada é menor, com maior probabilidade de identificar pelo menos um peptídeo bioativo (PIMENTA, 2009). Os ensaios de fracionamento a partir do hidrolisado total até a etapa de purificação dos peptídeos estão descritos a seguir.

4.9 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA

Antes do fracionamento peptídico, foi realizado o ensaio de inibição da ECA do hidrolisado total para que se comprovasse que esse *pool* peptídico sem ultrafiltração também apresentava atividade inibitória. Na **Tabela 3** são mostrados os valores de porcentagem de inibição de acordo com diferentes diluições do hidrolisado obtido em 2h de reação pela ação da Alcalase.

Tabela 3 – Efeito da diluição do hidrolisado proteico total (não-fracionado) sobre a atividade inibitória da ECA

Hidrolisado total	
Fator de diluição	Inibição da ECA (%)*
0	65 ± 0,63
2	35 ± 1,3
5	26 ± 1,3
10	n.d.**

* Os resultados representam a média ± desvio padrão (n=3).

** Não-detectada.

Observou-se inibição da ECA do hidrolisado total sem diluição, assim como, verificou-se que concentrações menores do hidrolisado quando incubados com a enzima, resultaram na perda da capacidade inibitória, revelando a relação entre a atividade e a concentração da(s) molécula(s) ativa(s). Portanto, para investigar a presença de peptídeos bioativos no hidrolisado total e identificar aqueles de maior bioatividade, o hidrolisado foi submetido ao fracionamento por RP-HPLC (**Figura 18**), cuja separação é baseada na diferença das propriedades hidrofóbicas dos peptídeos. Nesta primeira etapa de separação, foram coletadas frações a cada 5 min, exceto para a primeira fração, totalizando cinco frações (F1 - F5). Observou-se a presença maior de picos entre os tempos 15 a 30 min, concomitantemente com o aumento da concentração do solvente orgânico (40 a 60%) de acordo com o gradiente estabelecido no método. Esse perfil indica que as frações 3 e 4 apresentaram peptídeos mais hidrofóbicos em relação as demais frações.

Figura 18 - Perfil cromatográfico do hidrolisado proteico da semente de cupuaçu por RP-HPLC, utilizando coluna C_{18} (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Para eluição, foi utilizado gradiente entre 10 a 60% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA com taxa de fluxo de 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ e detecção de absorbância em 214 nm. A coleta das frações foi realizada a cada 5 min, exceto para a primeira fração, totalizando cinco frações (F1-F5).

Cada fração resultante da primeira etapa de fracionamento foi submetida à análise de atividade inibitória da ECA a partir de diferentes volumes aplicados no ensaio de fluorescência (substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH) e os resultados estão apresentados na **Figura 19**. As cinco frações apresentaram diferenças nos valores de atividade de inibição da ECA a partir dos diferentes volumes testados. Eluída primeiramente, a F1 apresentou um pico intenso entre os tempos de retenção 4 a 5 min, o qual muito provavelmente refere-se às albuminas, as quais não foram hidrolisadas pela ação da Alcalase, como indicado no SDS-PAGE. Embora tenha apresentado inibição da ECA, essa fração tem caráter menos hidrofóbico e, provavelmente, sem a presença de peptídeos quando comparada com as frações 3 e 4. Dessa forma essa fração não foi considerada relevante para ser explorada, posteriormente, na investigação dos peptídeos inibidores da ECA, assim como

também para as frações 2 e 5 que apresentaram baixa ou nenhuma inibição, respectivamente.

Figura 19 – Perfil da atividade inibitória da ECA (%) das cinco frações coletadas (F1-F5) na primeira etapa de fracionamento por RP-HPLC, utilizando no ensaio diferentes volumes de cada fração. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Por outro lado, as frações 3 e 4 apresentaram perfil bastante semelhante em relação a inibição da ECA a partir de diferentes volumes de amostra utilizados nos ensaios e observou-se diminuição no efeito inibidor frente aos menores volumes utilizados de cada fração na reação, mostrando a relação de dependência entre o efeito observado e a concentração da(s) molécula(s) ativas.

Em razão da fração 3 apresentar intensidade dos picos mais pronunciada e características hidrofóbicas de acordo com as condições de eluição e, também, apresentar atividade de inibição da ECA, ela foi escolhida para ser submetida à próxima etapa de fracionamento. Nessa segunda etapa, as subfrações da F3 foram coletadas a cada 2,5 min, exceto para a primeira e última subfração, totalizando sete subfrações (F3.1 – F3.7) a serem analisadas (**Figura 20**).

Figura 20 - Perfil cromatográfico do fracionamento da F3 por RP-HPLC, utilizando coluna C_{18} (Ascentis, Supelco) (250 x 4,6 mm; 5 μ m). A fração foi eluída de forma isocrática com 16% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA com taxa de fluxo de 1,4 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ e detecção de absorbância em 214 nm. A coleta das frações foi realizada a cada 2,5 min, exceto para a primeira e última fração, totalizando sete subfrações (F3.1-F3.7).

Cada subfração resultante dessa segunda etapa de separação foi submetida ao ensaio de atividade inibitória da ECA utilizando-se um volume de 10 μL de cada fração e os resultados estão apresentados na **Tabela 4**. De acordo com o ensaio, todas as subfrações (F3.1 a F3.7) apresentaram efeito inibidor da ECA. No entanto, destacaram-se as subfrações 3.2 e 3.4, as quais apresentaram maior atividade de inibição da ECA com aproximadamente 43 e 32%, respectivamente, quando comparadas com as demais frações analisadas. Por esta razão, essas duas subfrações foram selecionadas para a etapa de purificação, objetivando a coleta de picos isolados dos peptídeos e a análise do efeito inibidor da ECA para serem, então, posteriormente identificados por MS.

Tabela 4 – Atividade inibitória da ECA (%) das sete subfrações coletadas do fracionamento de F3 por RP-HPLC.

Subfração	Tempo de eluição (min)	Inibição da ECA (%)*
3.1	1,6 – 5,0	5,5 ± 1,8
3.2	5,0 - 7,5	42,7 ± 3,3
3.3	7,5 - 10	15,6 ± 2,3
3.4	10,0 - 12,5	31,9 ± 2,0
3.5	12,5 – 15,0	8,3 ± 2,7
3.6	15,0 - 17,5	7,3 ± 2,1
3.7	17,5 - 22,5	13,0 ± 3,7

*Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3).

As frações com maior atividade de inibição da ECA estão destacadas em negrito.

Os perfis cromatográficos da etapa de purificação das subfrações 3.2 e 3.4 estão apresentados na **Figura 21**. Embora seja uma etapa de purificação, o perfil cromatográfico ainda indicou muitos picos peptídicos em ambas as frações. No entanto, como foi alcançado o limite da técnica de separação em razão das características da coluna e fase móvel, optou-se por selecionar alguns picos de maior destaque no cromatograma e testá-los quanto à atividade de inibição da ECA.

Figura 21 - Perfil cromatográfico da etapa de purificação da subfração 3.2 (A) e da subfração 3.4 (B) por RP-HPLC, utilizando coluna C_{18} com base de carbono (Hypercarb, Thermo Scientific) (150 x 4,6 mm), em eluição isocrática de 16% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA com taxa de fluxo de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e detecção de absorbância em 214 nm. Os números sobre os picos identificam aqueles que foram testados para a atividade inibitória da ECA. Oito picos foram selecionados da subfração 3.2 e dez picos foram selecionados da subfração 3.4. A seta indica o pico que apresentou maior efeito inibidor da ECA em cada uma das separações.

Para a subfração 3.2 foram selecionados oito picos e para a subfração 3.4 foram selecionados dez picos e os resultados do ensaio de atividade inibitória da ECA estão apresentados nas **Tabelas 5 e 6**, respectivamente.

Tabela 5 – Atividade inibitória da ECA (%) dos oito picos coletados na etapa de purificação da subfração 3.2 por RP-HPLC.

Pico	Tempo de retenção (min)	Inibição da ECA (%) [*]
3.2.1	2,55	n.d ^{**}
3.2.2	3,4	n.d.
3.2.3	4,27	n.d.
3.2.4	5,3	n.d.
3.2.5	6,7	n.d.
3.2.6	11,6	n.d.
3.2.7	12,8	5,4 ± 0,9
3.2.8	23,0	9,0 ± 1,2

^{*} Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3).

^{**} Não-detectada.

As frações com maior atividade de inibição da ECA estão destacadas em negrito.

No ensaio de atividade de inibição, foram utilizados apenas 2 µL de cada pico coletado para serem incubados com a ECA. Ainda que a intensidade dos picos da subfração 3.2 tenha sido extremamente baixa, resultando em muitos picos sem atividade de inibição da ECA, o pico 3.2.8 foi o que apresentou um ligeiro efeito inibidor, destacando-se dos demais. Esses resultados sugerem que, mesmo a concentração baixa, esse pico tem potencial ação inibitória e que, muito provavelmente, esse baixo valor de inibição seja resultado dessa baixa concentração. Além disso, é possível que esse pico ainda não esteja totalmente purificado e que o efeito inibidor seja resultante da presença de dois ou mais peptídeos. No entanto, de uma maneira geral, os resultados apontaram de forma positiva a presença de peptídeos ativos nesse último pico.

Tabela 6 – Atividade inibitória da ECA (%) dos dez picos coletados na etapa de purificação da subfração 3.4 por RP-HPLC.

Pico	Tempo de retenção (min)	Inibição da ECA (%)*
3.4.1	2,5	n.d.**
3.4.2	3,07	n.d.
3.4.3	4,3	n.d.
3.4.4	4,6	n.d.
3.4.5	5,3	2,0 ± 1,4
3.4.6	5,8	n.d.
3.4.7	6,3	n.d.
3.4.8	6,7	1,7 ± 1,5
3.4.9	7,4	n.d.
3.4.10	23	10,8 ± 2,3

* Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3).

** Não-detectada

As frações com maior atividade de inibição da ECA estão destacadas em negrito.

De forma similar, isso pode ser observado também na subfração 3.4. Apenas o pico 3.4.10 apresentou um discreto efeito inibidor, se destacando das demais frações, sendo selecionado, juntamente com o pico 3.2.8, para ser identificado por MS

Para confirmar os resultados obtidos da etapa de purificação em relação à atividade de inibição da ECA nos picos 3.2.8 e 3.4.10, todas as etapas de fracionamento foram repetidas partindo de uma quantidade seis vezes maior do hidrolisado total. O objetivo foi coletar as frações já previamente identificadas com efeito inibidor sob a ECA, porém mais concentradas para que ao final da etapa de purificação, se confirmasse o efeito de inibição dos dois picos selecionados para prosseguir na etapa de sequenciamento por MS. Os resultados da repetição da atividade de inibição do material resultante de um novo fracionamento até a etapa de purificação dos picos 3.2.8 e 3.4.10 estão mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Atividade inibitória da ECA das etapas de separação da fração 3.

Etapas de separação	Volume (µL)	Inibição da ECA (%)*
Fração 3	5	100
Subfração 3.2	10	100
Subfração 3.4	10	100
Pico 3.2.8	5	41,4
Pico 3.4.10	5	100

* Os valores representam a média de uma triplicata de leitura.

Os picos 3.2.8 e 3.4.10 apresentaram claramente o efeito inibidor e a repetição do ensaio sob essas frações peptídicas mais concentradas mostraram uma atividade de inibição muito mais pronunciada em relação aos resultados anteriores. Além disso, a atividade de inibição foi muito mais acentuada no pico 3.4.10, indicando a possível presença de peptídeos com atividade inibitória maior em relação ao pico 3.2.8. Ainda assim, ambas as frações foram selecionadas para o sequenciamento por MS para identificar os peptídeos responsáveis por esse efeito inibidor observado.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ECA

O processo de sequenciamento peptídico foi realizado pela abordagem de separação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), que envolveu a realização de mais uma etapa cromatográfica precedente a análise de espectrometria de massas. Observou-se que os picos 3.2.8 e 3.4.10 apresentaram a presença de mais de um peptídeo, conforme apresentado na **figura 22**.

Além disso, como foram encontradas sequências maiores no pico 3.4.10, na **figura 23** é mostrado um exemplo da interpretação desses espectros desses peptídeos.

Figura 22 – Sequenciamento peptídico do pico 3.2.8 por LC-MS/MS. (A) perfil cromatográfico de separação por RP-HPLC monitorada a 214 nm; (B) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 2,4 min; (C) Zoom do principal íon, mostrando a distribuição isotópica e o estado de cargas (+1); (D) Espectro de fragmentação (MS²) do íon m/z 322.17; (E) Espectro MS² processado e interpretado do sequenciamento *de novo*.

Figura 23 – Dedução da sequência do peptídeo FLEK com duas cargas presente no pico 3.4.10 por LC-MS/MS. (A) Zoom do espectro do tempo de retenção de 9,8 min; (B) Espectro de fragmentação (MS²) do íon m/z 268.6; (C) Espectro MS² processado e interpretado; (D) Atribuição dos íons (a partir da sequência deduzida) ao espectro real; (E) Distribuição dos erros dos íons filhos.

Baseado na intensidade dos picos com absorbância no UV eluídos da cromatografia em fase reversa, oito sequências peptídicas foram caracterizadas pelo sequenciamento *de novo* a partir dos dois picos, sendo três dipeptídeos identificados no pico 3.2.8 e cinco peptídeos contendo de quatro a oito aminoácidos identificados no pico 3.4.10 (**Tabela 8**). No total, foram identificados peptídeos de massas moleculares entre 200 a 850 Da, que favorecem a ligação com a ECA, como já mencionado.

Tabela 8 – Sequência de aminoácidos e respectivas massas moleculares dos peptídeos encontrados nos picos 3.2.8 e 3.4.10

Pico	Peptídeo	Massa molecular (Da)
3.2.8	RF	321,17
	AF	236,26
	SF	252,11
3.4.10	LDNK	488,25
	MVVDKLF	850,40
	FLEK	533,30
	MEKHS	630,32
	GSGKHVSP	767,52

Após a obtenção dessas sequências, duas abordagens foram adotadas para tentar identificar as proteínas de origem dos peptídeos e o eventual conhecimento já disponível: 1) a busca dessas sequências inseridas nas proteínas de reserva das sementes do gênero *Theobroma* tanto do cacau como de cupuaçu, utilizando-se como ferramenta de busca o BLASTP (comparação de sequências proteicas contra dados de sequências proteicas) disponível no banco de dados BLAST³, e 2) a busca dessas sequências especificamente no acervo de peptídeos bioativos, usando como ferramenta de análise “perfil da atividade biológica potencial” no banco de dados BIOPEP.

Como resultado, as sequências mais curtas, como os dipeptídeos RF, AF, e SF foram, de fato, mais facilmente encontrados nas sequências das proteínas de

³ BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

reserva do gênero *Theobroma* em ambas as espécies. No entanto, não se constatou a presença das sequências peptídicas maiores identificadas neste trabalho. Assim, não se pode descartar que essas sequências peptídicas sejam provenientes de outras proteínas ainda não identificadas e, portanto, não se pode confirmar se esses peptídeos foram gerados a partir das globulinas, como estabelecido na hipótese inicial de estudo. No entanto, como forma de complementar esses resultados, foi realizada a busca desses peptídeos em sequências identificadas em outras sementes, sendo, para isso, feita a busca apenas na categoria sementes de plantas (tax id: 58024). Como resultado, observou-se que a sequência LDNK encontra-se presente, por exemplo, em uma proteína do sorgo (GI: 242077770), a sequência MVVDKLF encontra-se em uma proteína do feijão (GI: 593781789), a sequência FLEK encontra-se em uma proteína do milho (GI: 414586987), e, por fim, a sequência GSGKHVSP encontra-se em uma proteína do grão de bico (GI: 502173513). Portanto, ainda que essas sequências não tenham sido claramente identificadas nas proteínas de cupuaçu, elas estão presentes em proteínas de outros vegetais e, provavelmente, estão presentes em proteínas de cupuaçu que ainda não foram estudadas.

A análise *in silico* utilizando como ferramenta de análise “perfil da atividade biológica potencial” disponível no banco de dados BIOPEP revelou que os três dipeptídeos do pico 3.2.8 já foram reportados na literatura como peptídeos com atividade inibitória da ECA, corroborando os resultados encontrados quanto ao efeito inibidor desse pico. O dipeptídeo RF (Arg-Phe) (ID: 3489) foi isolado originalmente das proteínas do subproduto do processo de obtenção do saquê (em inglês, *sake lees*), cujo valor do IC_{50} determinado foi de 93 μM (SAITO et al., 1994). Já o dipeptídeo sintético AF (Ala-Phe) (ID: 7583) foi identificado como inibidor da ECA por Cheung et al. (1980) com um IC_{50} de 190 μM . E o dipeptídeo SF (ID: 7685) foi identificado após as etapas de fracionamento dos peptídeos presentes no alho com IC_{50} de 130,2 μM (SUETSUNA, 1998).

Em relação ao pico 3.4.10, a análise *in silico* não apontou nenhum dos peptídeos sequenciados como inibidores da ECA que já tenham sido identificados. No entanto, verificaram-se sequências peptídicas com atividade de inibição que constituem esses peptídeos (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Peptídeos identificados no pico 3.4.10 do hidrolisado proteico da semente de cupuaçu e sequências peptídicas já identificadas com atividade inibitória da ECA disponíveis no BIOPEP*.

Peptídeos	Sequências peptídicas bioativas	IC ₅₀ (μM)	Referência
LDNK	NK	810	SUETSUNA e NAKANO, 2000.
MVVDKLF	LF	349	MULLALLY et al., 1996.
	KL	50,2	SUETSUNA e NAKANO, 2000
FLEK	EK	n.a**	PLATERINK et al., 2008.
MEKHS	ME	n.a	PLATERINK et al., 2008.
	EK	n.a	PLATERINK et al., 2008
GSGKHVSP	VSP	10	MIYOSHI et al., 1991.
	GS	3.800	CHEUNG et al., 1980
	GK	5.400	CHEUNG et al., 1980
	SG	8.500	CHEUNG et al., 1980

* MINKIEWICZ et al., 2008

** n.a.significa não avaliado.

Uma vez que já se sabe que a porção C-terminal dos peptídeos é a responsável pela inibição da ECA, a porção dipeptídica C-terminal dos peptídeos LDNK, MVVDKLF e FLEK e a porção tripeptídica C-terminal do polipeptídeo GSGKHVSP se constituem em sequências importantes a se considerar. Muito provavelmente essas sequências que compõem a porção C-terminal de cada peptídeo identificado no pico 3.4.10 podem contribuir, individualmente, para um efeito inibidor, com destaque para o tripeptídeo C-terminal VSP que, além de estar em uma posição favorável, constitui com o menor valor de IC₅₀ (10 μM) quando comparados aos demais. Além disso, esses resultados também explicam a razão pelo qual o pico 3.4.10 apresentou atividade inibitória da ECA de 100%, sugerindo o efeito sinérgico entre os peptídeos. Nesse sentido, o único peptídeo ainda desconhecido quanto ao efeito inibidor pela posição C-terminal é o MEKHS. No entanto, se esse peptídeo gerar o dipeptídeo ME após uma digestão gastrointestinal,

por exemplo, poderá então apresentar algum um efeito inibidor, como encontrado por Platerink et al. (2008).

A partir dos resultados encontrados, todos os peptídeos sequenciados do pico 3.4.10 apresentam alta probabilidade de mostrar efeito inibidor sob a ECA, sendo validados individualmente a partir da sua estrutura sintetizada como descrito a seguir.

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

As curvas semilogarítmicas de dose-resposta ensaiadas para cada peptídeo inibidor estão representadas na **Figura 24**. Pelo perfil de inibição, verificou-se que os cinco peptídeos avaliados foram capazes de inibir a ação da ECA. No entanto, é possível observar que o peptídeo GSGKHVSP apresentou alta capacidade inibitória a baixas concentrações quando comparado aos demais peptídeos, indicando ser o potente inibidor. Além disso, verificou-se que os peptídeos FLEK e o MEHKS em concentrações entre 100 e 200 μM tiveram valores de atividade inibitória similares, indicando um possível limite de inibição.

Esses perfis corroboram os resultados de IC_{50} e da constante de inibição (K_i) (**Tabela 10**). O peptídeo GSGKHVSP teve os menores valores de IC_{50} e K_i , revelando seu potencial para inibir a ação da ECA, enquanto os peptídeos FLEK, MEHKS e MVVDKLF apresentaram valores semelhantes de IC_{50} e de K_i , indicando capacidades inibitórias similares. Por outro lado, o peptídeo LDNK apresentou os valores mais altos de IC_{50} e K_i em relação aos demais peptídeos, revelando menor potência inibitória.

GU e WU (2013) encontraram valores de IC_{50} muito semelhantes ao validar quatro peptídeos como inibidores da ECA. O peptídeo LSW ($IC_{50} = 2,7 \mu M$) apresentou alta atividade inibitória da ECA e os peptídeos IVF e LLF apresentaram capacidades inibitórias semelhantes ($IC_{50} = 63 \mu M$), mostrando que os peptídeos identificados neste trabalho apresentam IC_{50} comparáveis a outros peptídeos, mesmo com massas moleculares maiores.

Figura 24 – Determinação da IC_{50} dos peptídeos inibidores da ECA. As curvas semilogarítmicas para a determinação da IC_{50} relativo à inibição da ECA foram construídas a partir de diferentes concentrações (expressas em μM) dos seguintes peptídeos sintéticos: LDNK (A), FLEK (B), MEHKS (C), MVVDKLF (D) e GSGKHAVSP (E).

Tabela 10 – Valores de IC_{50} e da constante de inibição (K_i) dos peptídeos sintéticos selecionados como potenciais inibidores da ECA.

Peptídeo inibidor	IC_{50} * (μM)	K_i (μM)
LDNK	$131 \pm 15,0$	$30,84 \pm 3,1$
FLEK	$79,5 \pm 6,0$	$18,5 \pm 2,3$
MEKHS	$63 \pm 7,6$	$13,31 \pm 1,5$
MVVDKLF	$59,34 \pm 4,1$	$13,83 \pm 2,2$
GSGKHVSP	$3,11 \pm 0,4$	$0,74 \pm 0,07$

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

Ressalta-se que são poucos os peptídeos identificados com valores de IC_{50} abaixo de 1 μM como, por exemplo, o peptídeo LKP obtido do hidrolisado das proteínas do peixe, com valor de IC_{50} de 0,32 μM , e do peptídeo FKGRYYP obtido do hidrolisado das proteínas do frango, com valor de IC_{50} de 0,55 μM (FUJITA et al., 2000). Ainda assim, esses peptídeos não superam a potente ação de drogas sintéticas como o captopril, por exemplo, cujo valor de IC_{50} é de 0,021 μM (MINE et al., 2010).

Como destacado anteriormente na **Tabela 9**, a capacidade de inibição de cada peptídeo está associada aos seus fragmentos na região C-terminal. Como previsto, o peptídeo GSGKHVSP apresentou-se como um potente inibidor, uma vez que o fragmento VSP que constitui a sua sequência C-terminal já foi identificado com baixo valor de IC_{50} (MIYOSHI et al., 1991), atribuindo-se essa inibição a presença dos aminoácidos hidrofóbicos valina e prolina. Destaca-se, nesse caso, que mesmo com massa molecular maior, esse peptídeo ainda assim apresentou boa atividade inibitória. Esse resultado é bastante similar ao do peptídeo FFGRCVSP, obtido da ovoalbumina, cuja região C-terminal é também o peptídeo VSP. O valor de IC_{50} encontrado para esse peptídeo foi de 0,4 μM (FUJITA et al. 2000), e embora o valor seja menor do que o encontrado para o peptídeo GSGKHVSP, ainda assim reforça a contribuição do fragmento C-terminal para a capacidade inibitória do peptídeo, mesmo quando constituído de outros aminoácidos em sua estrutura. Além disso, o valor de IC_{50} do peptídeo GSGKHVSP é comparável a outros peptídeos de massas moleculares menores como VAP (2 μM) obtido do hidrolisado das proteínas do peixe (CHEN et al., 2012), FY (3,74 μM) encontrado no alho (SUETSUNA et al.,

1998), o LSW (2,7 μM) da proteína da soja (GU e WU, 2013) e o FFYY (1,9 μM) obtido do leite de soja (TOMATSU et al., 2013).

Já o peptídeo MVVDKLF, apresentou melhor resposta de inibição quando comparado ao seu dipeptídeo C-terminal LF, uma vez que o valor de IC_{50} foi muito menor que o valor encontrado por Mullally et al. (1996) ($\text{IC}_{50} = 349 \mu\text{M}$) e também por Gobbetti et al. (2000) ($\text{IC}_{50} = 383 \mu\text{M}$), sugerindo que outros aminoácidos como a lisina do tripeptídeo C-terminal de MVVDKLF podem ter contribuído para a maior na capacidade de inibição.

Em relação ao peptídeo LDNK, seu valor de IC_{50} foi similar ao encontrado para o peptídeo PSSNK (129, 3 μM) (LAU et al., 2014) e ao peptídeo YNK (125 μM) (MINE e SHAHIDI, 2006), os quais apresentam o dipeptídeo NK na região C-terminal. Por outro lado, não foram encontrados peptídeos com estruturas semelhantes aos peptídeos FLEK e MEKHS com atividade de inibição da ECA no banco de dados BIOPEP. Portanto, apesar da capacidade inibitória relativamente modesta, ambas se constituem em sequências inibidoras inéditas.

4.12 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS

Diversos trabalhos na literatura já reportaram que a maioria dos peptídeos com atividade inibitória da ECA isolados de diversas fontes proteicas, em sua maioria, são competitivos. No entanto, estudos mais recentes tem revelado que alguns peptídeos também podem ser não-competitivos e incompetitivos, indicando que a relação estrutura-atividade ainda não está totalmente esclarecida (JAO et al., 2012). Desse modo, os cinco peptídeos sintetizados foram avaliados, também quanto ao mecanismo de inibição. De acordo com o ensaio realizado, os peptídeos MVVDKLF e LDNK se apresentaram como peptídeos inibidores competitivos conforme ilustrados nas **Figuras 25 e 26**, respectivamente.

Figura 25 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (---○---) e na presença do peptídeo inibidor MVVDKLF nas concentrações de 112 μM (---●---) e 167 μM (---□---). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática.

Figura 26 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (---○---) e na presença do peptídeo inibidor LDNK nas concentrações de 183 μM (---●---) e 273 μM (---□---). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática.

Nesse caso, inibidores competitivos competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Ou seja, não há ligação entre enzima-substrato enquanto o inibidor ocupar o sítio ativo. Como o inibidor se liga reversivelmente à enzima, a inibição diminui à medida que a concentração de substrato aumenta, uma vez que é um processo competitivo. Sendo assim, quando a concentração de substrato excede a concentração de inibidor, a probabilidade desse inibidor se ligar a enzima é minimizada e a reação volta a atingir a $V_{\max}$ da reação. Portanto, a inibição resultante é dependente das concentrações de substrato e do inibidor, e da afinidade da enzima tanto pelo substrato como também pelo inibidor (VOET e VOET, 2011; NELSON e COX, 2005).

É possível observar nos gráficos que para o peptídeo inibidor MVVDKLF, a $V_{\max}$ não se altera (intercepto do eixo $1/v$), mas o valor de K_m (intercepto do eixo $I/[S]$) aumenta de 3 μM na ausência do inibidor para 8 μM na presença do inibidor MVVDKLF (170 μM). Valores similares no aumento de K_m também podem ser observados na presença do peptídeo LDNK, caracterizando ambos os inibidores como competitivos. Drogas sintéticas como o captopril, o enalapril e o lisinopril se enquadram nessa classificação de inibidores (BHUYAN e MUGESH, 2011). Wu et al. (2014) observaram que o peptídeo ASL ($\text{IC}_{50} = 102 \mu\text{M}$) é um inibidor da ECA competitivo e os estudos *in silico* de mecanismo molecular de interação entre a ECA e o inibidor revelaram que o peptídeo estabelece ligações de hidrogênio com determinados resíduos de aminoácidos que compõem os subsítios S1 e S2, um mecanismo bastante semelhante ao lisinopril, sugerindo que peptídeos competitivos aparentemente possam inibir por mecanismos de interação bastante semelhantes a esses modelos.

Por outro lado, os peptídeos inibidores FLEK e MEKHS foram classificados como inibidores não-competitivos, conforme os gráficos apresentados nas **Figuras 27 e 28**.

Figura 27 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (---○---) e na presença do peptídeo inibidor FLEK nas concentrações de 18 μM (---●---), 90 μM (---□---). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática.

Figura 28 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 mU) na ausência (---○---) e na presença do peptídeo inibidor MEKHS nas concentrações de 80 μM (---●---) e 160 μM (---□---). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática.

Para esse tipo de inibição, o inibidor não compete com o substrato e pode ocupar um sítio diferente da enzima em relação ao sítio de ligação do substrato. Sendo assim, o inibidor (I) pode interagir com a enzima (EI) e, também, formar o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), não formando produto. Nesse caso, se for uma inibição irreversível, enzima-inibidor podem se ligar covalentemente ou o inibidor, por exemplo, pode alterar a conformação do sítio ativo da enzima, tornando a ligação com o substrato ineficiente. Nesse caso, mesmo que a concentração de substrato ainda seja alta, a ação catalítica da enzima estará comprometida, nunca atingindo a $V_{\max}$. Já o valor de K_m não se altera para esse tipo de inibição (NELSON e COX, 2005). Ressalta-se que o valor da constante de inibição do inibidor pela enzima (K_i) e pelo complexo enzima-substrato (K_i') é o mesmo (VOET e VOET, 2011).

É possível observar que para ambos os peptídeos, a $V_{\max}$ (intercepto do eixo $1/v$) foi menor (em torno de 25%) na presença do inibidor em relação a $V_{\max}$ na ausência do inibidor. No entanto, os efeitos sobre os valores de K_m (intercepto do eixo $1/[S]$) foram mínimos, mantendo os valores em torno de 4 μM tanto na ausência quanto na presença dos inibidores.

Ni et. al (2012) ao avaliarem o peptídeo inibidor TPTQQS como não-competitivo, mostraram por meio de experimentos *in silico* de mecanismo molecular de inibição que o aminoácido C-terminal serina do hexapeptídeo interage com o Zn^{2+} que está presente no sítio ativo da enzima. Essa interação resulta em uma mudança na conformação do sítio catalítico, e conseqüentemente, na incapacidade catalítica da enzima. Ou seja, mesmo que o substrato possa se ligar ao sítio ativo da ECA, este não será convertido em produto. Pan et al. (2011) ao estudarem os mecanismos moleculares de interação, constataram que os peptídeos inibidores IPA e FP apresentaram interações hidrofóbicas, hidrofílicas, pontes de hidrogênio, assim como também interações com o Zn^{2+} no sítio catalítico da ECA, elucidando o modelo de inibição dos peptídeos com a enzima. Esses resultados são sugestivos de que os peptídeos FLEK e MEKHS identificados como não-competitivos podem ser inibidores da ECA pela interação de seus aminoácidos com o íon presente no sítio catalítico da ECA, inativando-a.

Na **Figura 29** é mostrado o efeito de inibição do peptídeo GSGKHVSP. De acordo com o gráfico de Lineweaver-Burk, o perfil revelado pelo peptídeo foi de

inibição mista, na qual houve aumento no valor de K_m e diminuição na V_{max} . O valor de K_m na ausência no inibidor foi de 3 μM e na presença do inibidor o valor de K_m aumentou de 5,8 μM (com adição de 1,34 μM de inibidor) para 10 μM (com adição de 10 μM de inibidor), sugerindo inibição competitiva. No entanto, para essa maior concentração de inibidor, houve uma redução de 46% na V_{max} , como ocorre na inibição não competitiva e, também, na acompetitiva. Devido ao cruzamento fora dos dois interceptos, a inibição é classificada como mista (VOET e VOET, 2011; NELSON e COX, 2005).

Figura 29 – Gráfico de Lineweaver-Burk no ensaio de cinética da hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH pela ação da ECA (0,5 μM) na ausência (---○---) e na presença do peptídeo inibidor GSGKHVSP nas concentrações de 1,34 μM (---●---), 4 μM (---□---) e 10 μM (---■---). Inserção do gráfico de Michaelis-Menten do ensaio de cinética enzimática.

Para este tipo de inibição, o inibidor liga-se tanto aos sítios de ligação do substrato quanto a outros sítios da enzima. Nesse caso, o inibidor pode se ligar a enzima livre, e também ao complexo enzima-substrato, diminuindo a velocidade de catálise. Nesse caso, a constante de inibição (K_i) do complexo EI e a constante de inibição do complexo ESI (K_i') não são equivalentes. Além disso, inibidores mistos são efetivos tanto em baixas concentrações como em altas concentrações de substrato (VOET e VOET, 2011). O gráfico de Michaelis-Menten inserido na **Figura**

29 indica claramente a capacidade de inibição do peptídeo frente ao aumento das concentrações de substrato testadas.

Ahn et al. (2012) verificaram que os peptídeos FEDYVPLSCF e FNVPLYE apresentaram inibição mista utilizando o substrato HHL. Do mesmo modo, Lunow et al (2015) observaram que os peptídeos IW e IPP também apresentaram mecanismo de inibição mista sob a ECA utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH, com discreto aumento de K_m e diminuição significativa de V_{max} . Segundo os autores, esse tipo de inibição parece estar relacionado à capacidade do inibidor de se ligar a diferentes sítios da enzima devido à presença de dois domínios na ECA (domínio-N e domínio-C). Os autores verificaram que o peptídeo IW, por exemplo, apresentou seletividade tanto para o domínio-N como para o domínio-C, sendo caracterizado em cada ensaio, individualmente, como inibidor competitivo devido ao aumento dos valores K_m nas diversas concentrações testadas de inibição. Por outro lado, quando esse mesmo peptídeo inibidor foi incubado com a enzima e o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH, o qual é hidrolisado por ambos os domínios da ECA com eficiências semelhantes (ARAÚJO et al., 2000), os resultados indicaram inibição mista. No caso da inibição da ECA, diversos obstáculos estão relacionados quanto ao mecanismo de inibição pelos peptídeos: a presença dos dois domínios da enzima que pode alterar o tipo de inibição e, também, pela sua classificação como uma metalopeptidase, na qual a remoção do zinco pelo peptídeo inibidor interfere na sua capacidade catalítica. Portanto, a interação entre os peptídeos inibidores e a ECA não está totalmente esclarecida.

Como forma de melhor caracterizar a estabilidade desses inibidores pela ação da ECA, cada peptídeo foi incubado com essa enzima a 37° por 60 min e avaliados por LC-MS se eram inibidores verdadeiros ou se eram hidrolisados pela ação da própria enzima. Os resultados confirmaram que os cinco peptídeos são inibidores verdadeiros, uma vez que todos tiveram hidrólise pela ação da enzima menor que 3% nas condições de ensaio (cromatogramas não mostrados). Esse ensaio foi fundamental, pois diversos peptídeos com atividade inibitória da ECA nem sempre são reportados como inibidores verdadeiros. Alguns peptídeos podem ser clivados e gerarem peptídeos com baixa atividade inibitória, sendo classificados como inibidores-substratos, ou também podem gerar peptídeos com alto poder de inibição, classificados como inibidores do tipo pró-droga (FUJITA et al., 2000). Tanto os

inibidores verdadeiros quanto os do tipo pró-droga contribuem positivamente para a atividade inibitória da ECA (CHEN et al., 2012).

Diante da validação desses peptídeos como inibidores verdadeiros, foi feita uma previsão *in silico* da estabilidade desses peptídeos quando submetidos à simulação da digestão gastrointestinal, utilizando-se como ferramenta a função “ação da enzima” disponível no banco de dados BIOPEP. Para isso, foram selecionadas as enzimas digestivas pepsina, tripsina e quimotripsina. Os fragmentos resultantes da ação combinada dessas três enzimas estão indicados na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Previsão de fragmentos resultantes da ação de enzimas digestivas sob os peptídeos inibidores da ECA, usando a ferramenta “ação da enzima” disponível no BIOPEP*.

Peptídeo inibidor	Fragmentos da digestão	
	Pepsina	Pepsina + Tripsina + Quimotripsina
LDNK	L - DNK	L - DNK
MVVDKLF	MVVDKL - F	MVVDK – L - F
FLEK	F – L - EK	F – L - EK
MEKHS	MEKHS	MEK - HS
GSGKHVSP	GSGKHVSP	GSGK - HVSP

* MINKIEWICZ et al., 2008

Os resultados permitem estimar que, muito provavelmente, em ensaios *in vivo* apenas os peptídeos MEKHS e GSGKHVSP resistiriam à ação da pepsina. Quanto aos demais, há liberação dos aminoácidos fenilalanina e leucina tanto na região N-terminal dos peptídeos LDNK e FLEK quanto na região C-terminal do peptídeo MVVDKLF. A pepsina cliva preferencialmente aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos como Phe, Tyr, Trp e Leu. A tripsina cliva os aminoácidos Lys, Arg e a quimotripsina cliva os aminoácidos aromáticos (NELSON e COX, 2005).

Por outro lado, é possível prever que nenhum peptídeo resistiria à ação combinada das enzimas pepsina + tripsina + quimotripsina, uma vez que as digestões de todos os peptídeos resultaram na liberação de di- ou tri- peptídeos como, também, aminoácidos livres.

Em relação ao peptídeo GSGKHVSP, observou-se que o fragmento HVSP é formado após a ação da combinação das três enzimas digestivas e muito provavelmente esse fragmento apresentaria atividade de inibição, uma vez que, aparentemente, é a região C-terminal VSP que contribui para o efeito inibidor.

Outro peptídeo que mantém sua estrutura tripeptídica C-terminal é o peptídeo LDNK. Lau et al (2014) também observaram que o peptídeo PSSNK após a digestão das enzimas pepsina e pancreatina, resultou na liberação da prolina como aminoácido livre, resultando no peptídeo SSNK, o qual elevou os valores percentuais na atividade de inibição. Esses resultados sugerem que o fragmento DNK resultante da ação digestiva do peptídeo LDNK poderia também apresentar efeito inibitório.

Com relação aos demais peptídeos, não foi possível prever se apresentariam atividade inibitória da ECA após a simulação da digestão, uma vez que seus fragmentos não foram encontrados no banco de dados BIOPEP como apresentando essa atividade biológica, sugerindo que ensaios *in vitro* e *in vivo* sejam necessários para confirmar a resistência desses peptídeos a ação das enzimas digestivas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicaram boa recuperação e expressivo teor de proteínas no isolado proteico obtido a partir da semente fresca de cupuaçu. Da mesma forma, as condições estabelecidas para a obtenção dos hidrolisados pela ação da Alcalase foram efetivas na formação de peptídeos como potenciais inibidores da ECA.

Cinco novos peptídeos inibidores foram identificados com sucesso a partir da purificação dos hidrolisados em RP-HPLC, sendo validados *in vitro* quanto a sua ação inibitória e o mecanismo de inibição. Dentre eles, destaca-se o peptídeo GSGKHVSP, considerado como potente inibidor, sendo os valores de IC_{50} e K_i comparáveis a outros peptídeos já descritos na literatura. Ao final, todos foram identificados como inibidores verdadeiros e sugere-se como trabalhos futuros a investigação desses novos peptídeos quanto à resistência à ação de enzimas digestivas, bem como da atividade biológica em ensaios *in vivo*.

Apesar do aumento bastante significativo nas pesquisas voltadas a área de peptídeos bioativos nos últimos anos, os obstáculos ainda são muitos, mas principalmente em relação à padronização de metodologias utilizadas, às técnicas de purificação peptídica e à carência de estudos voltados para os efeitos *in vivo* e ensaios clínicos. Nesse sentido, os desafios são ainda maiores em relação à perspectiva de aplicação desses peptídeos em alimentos funcionais, seja pela relação custo-benefício ou pela qualidade e segurança do produto. No entanto, este trabalho contribuiu de forma positiva para o avanço do conhecimento nessa área, não somente indicando o potencial de uso da semente de cupuaçu como fonte proteica alternativa, mas também na identificação de novas estruturas ativas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, 1435–1443, 2013.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **J.Agric. Food Chem.**, v. 27, 1256-1262, 1979.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishing, London, 1986.

AFOAKWA, E.O.; QUAO, J.; TAKRAMA, F.S.; BUDU, A.S.; SAALIA, F.K. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Food Research Journal**, v.19, n.3, 1071-1077, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, 2014. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO_19_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15/09/2014.

AHN, C.B.; JEON, Y.J.; KIM, Y.T.; JE, J.Y. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. **Process Biochemistry**.v. 47, n.12, 2240-2245, 2012.

AKIF, M.; GEORGIADIS, D.; MAHAJAN, A.; DIVE, V.; STURROCK, E.D.; ISAAC, R.E.; ACHARYA, K.R. High-Resolution Crystal Structures of *Drosophila melanogaster* Angiotensin-Converting Enzyme in Complex with Novel Inhibitors and Antihypertensive Drugs. **J. Mol. Biol.**, v. 400, n.3, 502–517, 2010.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, 861-868, 2005.

AMIN, I.; JINAP., S.; JAMILAH, B.; HARIKRISNA, K.; BIEHL, B. Oligopeptide patterns produced from *Theobroma cacao* L of various genetic origins. **J. Schi. Food Agric**, v. 82, n.7, 733-737, 2002.

ARAÚJO, M.C.; MELO, R.L.; CESARI, M.H., JULIANO, M.A., JULIANO, L.; CARMONA, A.K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v.39, 8519-8525, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International.**, 16^a ed, Arlington, 2 v, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed., Gaithersburg, 1-2 v, 2000.

BALASURIYA, N.; RUPASINGHE. H.P.V. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. **Food Chemistry**, v.135, 2320–2325, 2012.

BARBANA, C.; BOYE, J.I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 43, 1642–1649, 2010.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, 2010.

BERNSTEINK.E., SHEN, X.Z., GONZALEZ-VILALOBOS, R.A., BILLET, S., OKWAN-DUODU, D., ONG, F.S., FUCHS, S. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). **Curr. Opin. Pharmacol.**, 11, 105–111, 2011.

BIESALSKI, H.K.; DRAGSTED, L.O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MULLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, P. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v.25, 1202–1205, 2009.

BONHEVÍ, J.S. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **Eur. Food Res Technol.**, v. 221, 19–29, 2005.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v.43, 414–431, 2010.

BEYNON, R.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes**. The Practical Approach Series, Oxford University Press, 2 ed., 2001.

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**, v. 1, n.4, 2006.

CARVALHO, A. V.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; AMAYA-FARFAN, J. Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 1, p. 01-08, 2009.

CARVALHO, A. V.; PEZOA-GARCIA, N. H.; 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**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 127-134, 2005.

CARVALHO, A.V.; PEZOA-GARCIA, N.H., FARFÁN, J.A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, 986-993, 2008.

CHEN, J.; LIU, S.; CAI, R.Y.G.; JI, B.; WU, Y. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. **Journal Functional Food**, v.5, n. 4, 1684-1692, 2013.

CHEN, J.; WANG, Y.; ZHONG, Q.; WU, J.; XIA, W. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. **Peptides**, v.33, 52–58, 2012.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255. n. 2, pp. 401-405, 1980.

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. **J. Agric. Food Chem**, v. 57, 9234–9242, 2009.

CHIANG, W.D.; TSOU, M.J.; TSAI, Z.Y.; TSAI, T.C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. **Food Chemistry**, v.98, 725-732, 2006.

COCO, F.L.; LANUZZA, F.; MICALI, G.; CAPPELLANO, G. Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-Products of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v.45, 2007.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

COHEN, K.O., JACKIX, M.N.H. Obtenção e Caracterização Física, Química e Físico-Química de Liquor de Cupuaçu e de Cacao. **Braz. J. Food Technol.**, v.7, n.1, p.57-67, 2004.

CONTRERAS, M.M.; SANCHEZ, D.; SEVILLA, M.A.; RECIO, I.; AMIGO, L. Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v.32, n. 2, 71-78, 2013.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. (1995). Starch breakdown during banana ripening Sucrose Synthase and Sucrose Phosphate Synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, 347-351.

CORRADI, H.R.; SCHWAGER, S.L.U.; NCHINDA, A.T.; STURROCK, E.D.; ACHARYA, K.R. Crystal Structure of the N Domain of Human Somatic Angiotensin I-converting Enzyme Provides a Structural Basis for Domain-specific Inhibitor Design. **J. Mol. Biol.**, 357, 964–974, 2006.

CRISAN, D.; CARR, J. Angiotensin I-Converting Enzyme. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.2, n. 3, 2000.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochem. Pharmacol.**, v.20, 1637–48., 1971.

- DZIUBA, J. *et al.* Database of biologically active peptide sequences. **Nahrung**, v. 43, 190–195, 1999.
- EFRAIM, P., PEZOA-GARCÍA, N.H. JARDIM, D.C.P., NISHIKAWA, A., HADDAD, R., EBERLIN, M.N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30(Supl.1): 142-150, 2010.
- ERDMANN, K.; CHEUNG, W.Y.B.; SCHRODER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, 643–654, 2008.
- ERDOS, E.G. Conversion of Angiotensin to Angiotensin II. **The American Journal of Medicine**, v. 60, 1976.
- ERIZ, G.; SANHUEZA, V.; ROECHEL, M.; FERNÁNDEZ, K. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinífera* L. cv. País. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, 860 – 865, 2011.
- ESCRIVÁ, M.V.G. **Caracterização e seleção de gorduras de sementes do gênero *Theobroma* para aplicação tecnológica**. Campinas: Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 218p, 2002.
- ESTELLER, M. S.; JUNIOR, O.Z.; LANNES, S. C. S. Bolo de "chocolate" produzido com pó de cupuaçu e kefir. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 3, 2006.
- FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Rev. Nutr.**, vol.23, n.2, pp. 269-279. 2010.
- FUCHS, S., XIAO, H.D., HUBERT, C., MICHAUD, A., CAMPBELL, D.J., ADAMS, J.W., CAPECCHI, M.R., CORVOL, P., BERNSTEIN, K.E. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. **Hypertension**, 51, 267-274., 2008.
- FUJITA, H.; YOKOYAMA, K.; YOSHIKAWA, M. Classification and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins. **Journal of Food Science**, v.65, n. 4, 2000.
- GEORGIADIS, D.; BEAU, F.; CZARNY, B.; COTTON, J.; YIOTAKIS, A.; DIVE, V. Roles of the Two Active Sites of Somatic Angiotensin-Converting Enzyme in the Cleavage of Angiotensin I and Bradykinin: Insights From Selective Inhibitors. **Circ Res**, v. 93, n.2, 148-154, 2003.
- GLORIA, M. M. da; REGITANO-D'ARCE, M. A.B.. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 20, n. 2, 2000.
- GOBBETTI, M.; FERRANTI, P.; SMACCHI, E.; GOFFREDI F.; ADDEO, F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. **Applied and Environment Microbiology**, v.66, n.9, 3898–3904, 2000.

GONDIM, T.M.; THOMAZINI, M.J.; CAVALCANTE, M. de J.B.; SOUZA, J.M.L. de. **Aspectos da produção de cupuaçu**. Rio Branco: Embrapa, Acre, 43p. 2001.

GORETTA, L.A.; OTTAVIANI, J.I.; FRAGA, C.G. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Activity by Flavanol-Rich Foods. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, 229-234, 2006.

GORETTA, L.A.; OTTAVIANI, J.L.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. **FEBS Letters**, v.555, 597-600, 2003.

GOUDA, K.G.M.; GOWDA, L.R.; APPURAO, A.G.; PRAKASH, V. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Glycinin, the 11S Globulin of Soybean (*Glycine max*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 13, 4568-4573, 2006.

GUANG, C.; PHILLIPS, R.D.; JIANG, B.; MILANI, F. Three key proteases — angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin — within and beyond the renin-angiotensin system. *Archives of Cardiovascular Disease*, 105, 373—385, 2012.

GUANG, C.; PHILLIPS, R. D. Plant Food-Derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, 5113–5120, 2009.

GU, Y.; WU, J. LC–MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. **Food Chemistry**, v.141, 2682–2690, 2013.

HAMMERSTONE J.F.J.; ROMANCZYK, L.J.J.; AITKEN, W.M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. **Phytochemistry**, v.35, n. 5, pp. 1237-1240, 1994.

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

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M.M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.165, 23–35, 2011.

HOLMQUIST, B.; BUNNING, P.; RIORDAN, J.F. A continuous spectrophotometric assay for the angiotensin converting enzyme. **Anal Biochem**, v. 95, n.2, 540-548, 1979.

HONG, F.; MING, L.; YI, S. ZHANXIA, L.; YOUNGQUAN, W. CHI, L. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? **Peptides**, v.29, 1062-1071, 2008.

JAMDAR, S.N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M.D. ; JUAN, F.; YARDI, V.; SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v.121, 178–184, 2010.

JANG, J.H.; JEONG, S.C.; KIM, J.H.; LEE, Y.H.; CHEOUL, Y.; LEE, J.J.S. Characterisation of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. **Food Chemistry**, v.127, 412–418, 2011.

JAO, C.L.; HUANG, S.L.; HSU, K.C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. **Biomedicine**, v.2, n.4, 130-136, 2012.

KIM, S.K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **J. of Functional Foods**, v.2, n.1, 1-9, 2010.

KIRCHHOFF, P.M.; BIEHL, B.; CRONE, G. Peculiarity of the Accumulation of Free Amino Acids during Cocoa Fermentation. **Food Chemistry**, v.31, 295-311, 1989.

KODERA, T.; NILO, N: Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats. **J Food Sci**, v. 71, 164-173, 2006.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16, 945–960, 2006.

KRATZER, U.; FRANK, R.; KALBACHER, H.; BIEHL, B.; WOTEMEYER, J.; VOIGT, J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, v.113, 903–913, 2009.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **Am J Med.**, v. 113, n. 9B, 71S–88S, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, 680-685, 1970.

LAHOUE V., REHEL, K., TAUPIN, L., HARAS, D., ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v.118, n.3, pp. 870-875, 2010.

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L.; AMARAL, R. L. Formulação de "chocolate" de cupuaçu e reologia do produto líquido. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 38, n. 4, Dec. 2002.

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L.. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 39, n. 1, Mar. 2003.

LAU, C.C.; ABDULLAH, N.; SHUIB, A.S.; AMINUDIN, N. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach identified by LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v.148, 396–401, 2014.

LEE, J.K.; JEON, J.K.; BYUN, H.G. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 7, 381-389, 2014.

LERCETEAU, E.; ROGERS, J.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, v.79, n.4, 619-625, 1999.

LI, G.H.; LE, G.W.; SHI, Y.H.; SHRESTHA, S. Angiotensin I– converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, v.24, 469–486, 2004.

LI, G.H.; LIU, H.; SHI, Y.H.; LE, G.W. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, 219–224, 2005.

LI, Y.; FENG, Y.; ZHU, S.; LUO, C.; MA, J.; ZHONG, F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.25, 17–23, 2012.

LIU, J.; YU, Z.; ZHAO, W.; LIN, S.; WANG, E.; ZHANG, Y.; HAO, H.; WANG, Z.W.; CHEN, F. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 122, n.4, 1159–1163, 2010.

LO, W.M.Y.; LI-CHAN, E.C.Y. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from In Vitro Pepsin-Pancreatin Digestion of Soy Protein. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, 3369-3376, 2005.

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

LOPES, A.S.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; AMAYA-FARFÁN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28, n.2, 263-268, 2008.

LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, suppl. 10, 206-212, 2003.

LUNOW, D.; KAISER, S.; RUCKRIEMEN, J.; PHL, C.; HENLE, T. Tryptophan-containing dipeptides are C-domain selective inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Food Chemistry**, v.166, 596–602, 2015.

MAMONE, G.; PICARIELLO, G.; CAIRA, S.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.43, 7130–7142, 2009.

MARTELLI, A. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona e Homeostase Cardiovascular. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.12, n.4, 51-56, 2010.

MATSUI, T.; MATSUMOTO, K. Antihypertensive peptides from natural resources. **Lead Molecules from Natural Products**, v. 2, 255-271, 2006.

MATTIETO, 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)**. Campinas: Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 164 p., 2001.

MEDEIROS, M.L.; LANNES, S.C.S. Propriedades físicas de substitutos do cacau. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.30 (supl. 1), 243-253, 2010.

MESSERLI, F. H., WEBER, M. A., BRUNNER, H.R. Angiotensin II receptor inhibition. A new therapeutic principle. **Arch Intern Med**, v.156, 1957–65, 1996.

MINE, Y.; LI-CHAN, E.; JIANG, B. **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. IFT Press, USA, 1. Ed., 2010.

MINE, Y.; SHAHIDI, F. Membrane-Based Fractionation and Purification Strategies for Bioactive Peptides. In: MINE, Y.; SHAHIDI, F. **Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease**. 639-658. Boca Raton: FL, Taylor & Francis Group, 2006.

MINKIEWICZA, P.; DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; DZIUBA, M.; DAREWICZ, M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **J AOAC**, v. 91, n. 4, 965-80, 2008.

MIYOSHI, S.; ISHIKAWA, H.; KANEKO, T.; FUKUI, F.; TANAKA, H.; MARUYAMA, S. Structures and Activity of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors in an α -Zein Hydrolysate. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n.5, 1313-1318, 1991.

MULLALLY, M.M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, 377, 259-260, 1996.

MURRAY, B.A.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, 773-791, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger, principles of biochemistry**, 4. ed, 2005.

NEVES, R. A. M.; CAMPOS, T.; MARQUEZ, U. M. L. Modulação da pressão arterial por hidrolisados proteicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, p.81-86, 2006.

NI, H.; LI, L.; LIU, G.; HU, S.Q. Inhibition Mechanism and Model of an Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Hexapeptide from Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Plos one**, v.7, n.5, 2012.

ONDETTI, M.A., CUSHMAN, D.W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. **Annu Rev Biochem**, v.51, 283-308, 1982.

OTTAVIANI, J.; ACTIS-GORETTA, L.; VILLORDO, J.J.; FRAGA, C.G. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. **Biochemistry**, v.88, 359–365, 2006.

PAN, D.; CAO, J.; GUO, H., ZHAO, B. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v.130, n.1, 121–126, 2012.

PAN, D.; GUO, H.; ZHAO, B. CAO, J. The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, 3898–3904, 2011.

PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M.; KUSSMANN, M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. **Journal of Proteomics**, v.75, n.12, 3546–3559, 2012.

PATIL, B.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTHY, K.N.C.; VIKRAM, A. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities and Challenges. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, n.18, 2009.

PIMENTA, D.C. **Biological effect driven peptidome of the *Bothrops jararaca* venom**. In: LIMA, M.E. et al. Animal Toxins: State of the Art – Perspectives in Health and Biotechnology. UFMG: Minas Gerais, 497-513, 2009.

PLATERINK, C.J.V.; JANSSEN, H.G.M.; HAVERKAMP, J. Application of at-line two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry for identification of small hydrophilic angiotensin I-inhibiting peptides in milk hydrolysates. **Anal Bioanal Chem**, v.391, n.1, 299–307, 2008.

POKORA, M.; ZAMBROWICZ, A.; DABROWSKA, A.; ECKERT, E.; SETNER, B.; SZOLTYYSIK, M.; SZWEWCZUK, Z.; ZABLOCKA, A.; POLANOWSKI, A.; TRZISZKA, T.; CHRZANOWSKA, J. An attractive way of egg white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. **Food Chemistry**, v.151, 2014, 500–505, 2014.

PORTER, L.J.; Tannins. **Method in plant biochemistry**, v.1, 389-419, 1989.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.F.; GROLEAU, P.E. Membrane-Based Fractionation and Purification Strategies for Bioactive Peptides. In: MINE, Y.; SHAHIDI, F. **Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease**. 639-658. Boca Raton: FL, Taylor & Francis Group, 2006.

PUGLIESE, A.G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma glandiflorum*) e do cupulate: composição e possíveis benefícios**. São Paulo: Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, 146 p., 2010.

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

REISDORFF, C.; ROHSIUS, C.; SOUZA, A.G.C.; 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. **J Sci Food Agric**, v.84, 693–700., 2004.

RICCI, A. R.; OLALLA, M. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.50, n.5, p.390-402, 2010.

ROCHA NETO, O.G.; JUNIOR, O.R.C.; CARVALHO, J.E.U.; LAMEIRA, O.A.; SOUZA, A.R.; MARADIAGA, J.B.G. Cupuaçu. In: **Principais produtos extrativos da Amazônia e seus coeficientes técnicos**. Brasília: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

Renováveis, Centro Nacional de Desenvolvimento Sustentável das Populações Tradicionais, p.24-40, 1999.

ROHSIUS, C.; MATISSEK, R.; LIEBEREI, R. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. **Eur Food Res Technol**, v.222, 432–438, 2006.

ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V.C. Caracterização Físico-química do Isolado Protéico de Soro de Leite e Gelatina de Origem Bovina. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, n. 2, p. 137-143, 2007.

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

RUIZ-GIMÉNEZ, P.; SALOM, J.B.; MARCOS, J.F.; VALLÉS, S.; MARTINEZ-MAQUEDA, D.; RECIO, I.; TORREGROSA, G.; ALBORCH, E.; MANZANARES, P. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. **Food Chemistry**, v.131, n.1, 266–273, 2012.

RUSCONI, M.; CONTI, A. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological Research**, v.61, 5–13, 2010.

SAAVEDRA, L.; HEBERT, E.M.; MINAHK, C.; FERRANTI, P. An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. **Food Research International**, v. 54, n.1, 925–934, 2013.

SAMADI, B.; AMINUDDIN, F.; HAMID, M.; SAARI, N.; ABDUL-HAMID, A.; ISMAIL, A. Hypoglycemic effects of cocoa (Theobroma cacao L.) autolysates. **Food Chemistry**, v.134, 905–911, 2012.

SAMADI, 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.

SANCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTITA, J.; MILLAN, F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 64, 237-243, 1999.

SECRETARIA DA AGRICULTURA DO PARÁ – SAGRI, 2014. Disponível em:<http://www.sagri.pa.gov.br/publicacoes/view/77/a_fruticultura_no_estado_do_para> Acesso em: 08/06/2014.

SICA, D. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. In **Hypertension Primer. The Essentials of High Blood Pressure**, 4th ed.; Izzo, J. L., Sica, D. A., Black, H. R., Eds.; American Heart Association: Dallas, TX,; pp 457-61., 2008.

SILVA, C.R.S.; FILGUEIRA, A. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. **Plant Syst. Evol.**, v. 250, 93–104, 2005.

SILVA-SANCHEZ, C.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; LEON-GALVAN, M. F.; LUMEN, B. O.; LEON-RODRIGUEZ, A.; GONZALEZ de MEJIA, E. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, 1233–1240, 2008.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and technology**. Westport: Avi Publishing, 294 p., 1972.

SAITO, Y.; WANEZAKI, K.; KAWATO, A.; IMAYASU, S. Structure and activity of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Sake and Sake Lees. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.58, n.10, 1767-1771, 1994.

SOARES, R.A.M. **Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado proteico do grão de amaranto**. São Paulo: Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de São Pública, Universidade de São Paulo, 2008.

SOUSA, A.G.O.; FERNANDES, D.C.; ALVES, A.M.; FREITAS, J.B.; NAVES, M.M.V. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Research International**, v. 44, n.7, 2319-2325, 2011.

SUETSUNA, K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). **J. Nutr. Biochem.**, v.9, n.7, 415– 419, 1998.

SUETSUNA, K.; NAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). **J. Nutr. Biochem.**, v.11, n.9, 450–454, 2000.

THILAKARATHNA, S.H.; RUPASINGHE, H.P.V. Anti-atherosclerotic effects of fruit bioactive compounds: A review of current scientific evidence. **Can. J. Plant Sci.**, v.92, n.3, 407- 419, 2002.

TIENGO, A.; FARIA, M.; NETTO, F.M. Characterization and ACE-Inhibitory Activity of Amaranth Proteins. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, 2009.

TOMATSU, W.; SHIMAKAGE, A.; SHINHO, M.; YAMADA, S.; TAKAHASHI, S. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya Milk. **Food Chemistry**, v.136, n.2, 612–616, 2013.

TORRUCO-UCO, J.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTINEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BETANCUR-ANCONA, 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, 1597–1604, 2009.

TOVAR-PÉREZ, E.G.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; FARRÉS-GONZÁLEZ, A.; SORIANO-SANTOS, J. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. **Food Chemistry**, v.116, n.2, 437–444, 2009.

TZACOS, A.G.; GALANI, A.S.; SPYROULIAS, G.A.; CORDOPATI, P.; MANESSI-ZOUPA, E.; GEROTHANASSIS, I. Structure function discrimination of the N- and C- catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl⁻ activation and peptide hydrolysis mechanisms. **Protein Engineering**, v. 16, n. 12, 993-1003, 2003.

UCO, J.T.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTINEZ-AUALA, A.; DÁVILLA-ORTIZ, G.; BETANCUR-ANCONA, 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, 1597–1604, 2009.

UDENIGWE, CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n.2, 137-143, 2014.

UDENIGWE, C.C.; ALUKO, R.E. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, 2012.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Campinas: Dissertação - (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 114 p, 1999.

VEN, C.V.V; GRUPPEN, H.; BONT, D.B.A.; VORAGEN, A.G.J. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. **International Dairy Journal**, v.12, 813–820, 2002.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n.13, 4705–4714, 2006.

VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento**. Belém: Clube do Cupu. 1993. 108 p.

VERMEIRSEN, V.; CAMP, V.J.; DEVOS, L.; VERSTRAETE. Release of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity During in Vitro Gastrointestinal Digestion : from Batch Experiment to Semicontinuous Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.19, 5680–5687, 2003.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. John Wiley & Sons: New York, 4 ed., 2011.

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

VOIGT, J.; VOIGT, G. HEINRICHS, V.H.; WRANN, D.; BIEHL, B. *In vitro* studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: The significance of endoprotease specificity. **Food Chemistry**, v.51, 7-14, 1994.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O.A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, Z.; MORK, S.; BERGE, R.K. Fish Protein Hydrolysate Reduces Plasma Total Cholesterol, Increases the Proportion of HDL Cholesterol, and Lowers Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Activity in Liver of Zucker Rats. **J Nutr**, v. 134, n.6, 1320-7, 2004.

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**, v. 8, n. 4, 170-177, 1986.

WHITLOCK, B.A.; BAUM, D.A. Phylogenetic relationships of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene vicilin. **Syst Bot**, n.24, 128–138, 1999.

WILSON, J.; HAYES, M.; CARNEY, B. Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. **Food Chemistry**, v.129, 235–244, 2011.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review of polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v.33, 423–447, 2000.

WU, J., ALUKO, R. E.; MUIR, A. D. Purification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of defatted canola meal. **Food Chemistry**, v.111, n.4, 942–950, 2008.
WU, J., ALUKO, R. E.; MUIR, A. D. An improved method for direct injection HPLC assay of angiotensin converting enzyme-catalyzed reactions. **Journal of Chromatography A**, v.950, n.1-2, 125–130, 2002.

WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, v.35, n.4, 367–375, 2002.

WU, Q.; JIA, J.; YAN, H.; DU, J.; GUI, Z. A novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study. **Peptides**, *in press*, 2014.

YUST, M.M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, v.81, n.3, 363–369, 2003.

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 da Pós-Graduação

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

9131 - 6503457/1 - Juliana Nunes da Cruz

Email: julianano@usp.br
Data de Nascimento: 13/08/1987
Cédula de Identidade: RG - 44.246.369-8 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Tecnólogo em Alimentos - Faculdade de Tecnologia Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2008
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Tecnologia Nuclear - Aplicações - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 16/12/2010
Início da Contagem de Prazo: 16/12/2010
Data Limite para o Depósito: 16/12/2014
Orientador: Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 16/12/2010 até o presente. E.Mail: jronasci@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 16/12/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 20/02/2013
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: Ingressou no Doutorado em 16/12/2010
 Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Impresso em: 24/11/14 22:36:17

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

9131 - 6503457/1 - Juliana Nunes da Cruz

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5899-2/1	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	14/03/2011	24/04/2011	90	6	100	A	N	Concluída
BTC5743-2/5	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	28/06/2011	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/6	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	30/06/2011	120	8	100	A	N	Concluída
FBA5870-6/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	05/04/2011	13/06/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5741-3/1	Química e Bioquímica de Alimentos I	18/08/2011	21/09/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5742-2/1	Química e Bioquímica de Alimentos II	06/10/2011	09/11/2011	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Bapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0405 Análise de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/08/2013	10/12/2013	-	3	0	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	27
Estágios:			
Total:	0	20	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora do Programa, em Sessão de 10/02/2014.

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 21/07/2014

Impresso em: 24/11/14 22:36:17