



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS APLICADOS À SEPARAÇÃO DE
PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE
HIDROLISADO DA CASEÍNA BOVINA

EVALDO CARDOZO DE SOUZA JÚNIOR

2012

EVALDO CARDOZO DE SOUZA JÚNIOR

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS APLICADOS À SEPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM
ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE HIDROLISADO DA CASEÍNA BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^ª.:
D.Sc. Jane Sélia dos Reis Coimbra

Co-Orientadora: Prof^ª.:
D.Sc. Renata C. F. Bonomo

Co-Orientador: Prof.:
D.Sc. Eduardo Basílio Oliveira

**ITAPETINGA – BAHIA
BRASIL
2012**

637.1277 S715s	<p>Souza Júnior, Evaldo Cardozo de.</p> <p>Sistemas aquosos bifásicos aplicados à separação de peptídeos com atividade anti-hipertensiva de hidrolisado da caseína bovina. / Evaldo Cardozo de Souza Júnior. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011. 69 fl..</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Senso</i>” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D Sc. Jane Sélia dos Reis Coimbra e co-orientação da Prof^a. D Ss. Renata F. S. Bonomo e do Prof. D Sc. Eduardo Basílio Oliveira.</p> <p>1. Sistema Aquoso Bifásico (SAB) – Separação de proteína. 2. Hipertensão – Tratamento – Ingestão – Peptídeos inibidores – Enzima Conversora Angiotensina (ECA). 3. Caseína bovina – Hidrólise – Peptídeos bioativos I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Coimbra, Jane Sélia dos Reis. III. Bonomo, Renata F. S. IV. Oliveira, Eduardo Basílio. V. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD(21): 637.1277</p>
-----------------------	--



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS APLICADOS À SEPARAÇÃO DE PEPÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIHIPERTENSIVAS DE HIDROLISADOS DE CASEÍNA BOVINA”.

Autor: EVALDO CARDOZO DE SOUZA JÚNIOR

Orientadora: JANE SÉLIA DOS REIS COIMBRA, DSc., UFV/UESB

Co-orientadora: RENATA CRISTINA FERREIRA BONOMO, DSc., UESB

Co-orientador: EDUARDO BASÍLIO DE OLIVEIRA, DSc., UFV

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof.^a Dr.^a Jane Sélia dos Reis Coimbra, DSc., UFV/UESB


Prof. Dr. Abraham Damian Giraldo Zuniga. UFT


Prof. Dr. Genivaldo Sales Nunes. UESB

Data da Realização: 14 de fevereiro de 2012.

*Dedico este trabalho à minha
família, em especial, aos meus pais,
Iolanda dos Anjos Rios e Evaldo
Cardozo de Souza, por terem me
ensinado valores os quais nunca vão
mudar e sempre trarão bons frutos.
À Vanessa, pelo companheirismo e
palavras de otimismo.*

AGRADECIMENTO

Agradeço, primeiramente, a Deus que está presente, sendo companhia constante em todos os momentos da minha vida e grande responsável pelas minhas conquistas;

À minha família, que tem me apoiado no decorrer de minha vida, em especial, agradeço aos meus pais (Evaldo e Iolanda) e à minha irmã (Itana) e à minha sobrinha e afilhada (Isabella), pelo exemplo de força, dedicação, determinação e amor;

À minha namorada Vanessa, que me apoia em tudo que faço com muito carinho e amor;

À Professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela orientação, auxílio e atenção durante a realização deste trabalho;

À Professora Renata Cristina Ferreira Bonomo, pela amizade e pelos valiosos ensinamentos durante toda minha formação acadêmica;

Ao Professor Eduardo, pela atenção, disposição, incentivo e toda ajuda durante o desenvolvimento do meu mestrado;

Aos meus amigos, que são verdadeiros companheiros, tanto na Universidade, quanto na vida pessoal, em especial a Rúbner;

Aos meus amigos e colegas do LOP, em especial, a Angélica e Bernardo, pelo incentivo e apoio constantes;

Aos meus colegas do LEP, pelos agradáveis momentos proporcionados e compartilhamento de conhecimento;

À FAPESB, pela concessão da bolsa, à UFV e à UESB, pela oportunidade e condições de realizar meu trabalho;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste objetivo.

MUITO OBRIGADO!

*"É justamente a possibilidade de
realizar um sonho que torna a vida
interessante"*

Paulo Coelho

RESUMO

SOUZA JR, E. C.¹ **Sistemas Aquosos Bifásicos Aplicados à Separação de Peptídeos com Atividade Anti-Hipertensiva de Hidrolisado da Caseína Bovina.** Itapetinga – BA: UESB, 2012.69p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos)

Os diferentes tipos de propriedades biológicas apresentadas pelas proteínas do leite, como atividade antimicrobiana, imunoestimulante e anti-hipertensiva, estão associados à presença de peptídeos bioativos em determinadas sequências da proteína. Peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) com atividade anti-hipertensiva são liberados após a hidrólise da proteína em que se encontra por via enzimática e/ou química. Há evidências que sua ingestão por meio de alimentos possa auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão. Dessa forma, estudos têm focado a produção e o isolamento de peptídeos com atividade inibidora da ECA a partir de proteínas de diferentes fontes alimentícias. Portanto, o presente estudo objetivou: *i*) hidrolisar por via enzimática a caseína do leite para obtenção de peptídeos bioativos, com propriedade anti-hipertensiva; *ii*) quantificar a porcentagem da atividade inibitória da ECA e das frações do hidrolisado da caseína do leite, em diferentes tempos de hidrólise; *iii*) estabelecer a constituição dos sistemas aquosos bifásicos (SAB's) mais adequada à separação destes peptídeos hipotensivos; e *iv*) determinar dados do coeficiente de partição dos peptídeos em SAB's. Os hidrolisados foram obtidos, sob temperatura controlada, utilizando uma solução de caseína preparada em tampão fosfato dissódico adicionada da enzima tripsina de pâncreas bovino. Amostras do meio hidrolisado foram coletadas em 1, 2, 5, 8 e 24 horas após o início da hidrólise, sendo cada fração quantificada quanto à capacidade de inibição da ECA. O hidrolisado que apresentou maior atividade inibitória da ECA, *in vitro*, foi usado na avaliação da partição dos peptídeos bioativos com SAB's. Para tanto, foram utilizados SAB's compostos por polietileno glicol (PEG) de massa molar 1500 g.mol⁻¹ e sais de tartarato de sódio e potássio, fosfato de sódio e fosfato de potássio, sob temperatura controlada. Os diagramas de equilíbrio, a 25°C, para SAB's formados por PEG + tartarato de sódio e potássio e PEG + fosfato de sódio, foram obtidos neste trabalho. Dados do coeficiente de partição do hidrolisado da caseína indicaram que, para SAB's contendo fosfato de sódio, os peptídeos migraram preferencialmente para a fase rica em sal; para SAB's formados tartarato de sódio e potássio, os peptídeos precipitaram na fase salina; e nos SAB's compostos por fosfato de potássio, os peptídeos migraram em sua totalidade para a fase polimérica.

Palavras-chave: diagramas de equilíbrio, polietilenoglicol, peptídeos, anti-hipertensivo.

¹ Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra, D. Sc., UFV e Co-orientadores: Renata Cristina Ferreira Bonomo, D. Sc. UESB; Eduardo Basílio Oliveira, D. Sc. UFV.

ABSTRACT²

SOUZA JR, E. C. **Aqueous Biphasic Systems Applied to the Separation of Peptides with antihypertensive activity of hydrolysis of bovine casein.** Itapetinga - BA: UESB, 2012.69p. (Dissertation - Master in Food Engineering - Food Process Engineering)

The presence of bioactive peptides in protein sequences are associated with different types of biological properties presented by milk proteins, such as antimicrobial, immunostimulant and anti-hypertensive. Peptide able to inhibit the angiotensin-converting enzyme (ACE) presented antihypertensive activity and can be released after the hydrolysis of some whey protein, such as β -lactoglobulin and casein. There is evidence that the intake of these kinds of peptides through food may acts in the prevention and non-pharmacological treatment of hypertension. Thus, in this study were evaluated: i) the conditions of enzymatic hydrolysis of milk casein to obtain bioactive peptides with anti-hypertensive properties, such as the time of protein hydrolysis, ii) the percentage of ECA inhibited in each hydrolyzed fraction obtained, iii) the more appropriate aqueous two-phase systems (ATPS) to separate the peptides of each hydrolyzed fraction, and iv) data of the partition coefficient of the peptides in each ATPS. The milk casein hydrolysates were obtained under controlled temperature (37 °C), using an aqueous casein solution prepared in sodium phosphate buffer (pH = 8.4) added of the trypsin enzyme (bovine pancreas). Samples of hydrolyzed protein were collected at (1, 2, 5, 8 and 24) hours after the start of the reaction. The ability of the peptides to inhibit the ACE was quantified in each sample. The fraction with the highest ACE inhibitory activity in vitro was carried out to the separation tests using ATPS. The aqueous biphasic systems were composed by polyethylene glycol (PEG) of molar mass 1500 g/mol and salts (sodium and potassium tartrate, sodium phosphate and potassium phosphate). Partition coefficient data (temperature = 25 °C) of the peptides pointed to the PEG 1500 + potassium phosphate + water system as the more appropriate to separate peptide with antihypertensive from casein hidrolisate. The peptides migrated preferentially to the phase rich in polymer. Additionally, phase equilibrium diagrams, at 25 °C, were obtained for ATPS formed by PEG 1500 + sodium potassium tartrate, and PEG 1500 + sodium phosphate were obtained in this work.

Keywords: equilibrium diagrams, polyethylene glycol, peptides, anti-hypertensive activity.

² Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra, D.Sc., UFV and Co-adviser Renata Cristina Ferreira Bonomo, D. Sc. UESB; Eduardo Basílio Oliveira, D. Sc. UFV.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades funcionais da caseína e suas aplicações em alimentos.....	19
Tabela 2 -	Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 (g/mol) e tartarato de sódio e potássio, a 25°C.....	38
Tabela 3 -	Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 (g/mol) e fosfato de sódio, a 25°C.....	38
Tabela 4 -	Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 (g/mol) + fosfato de Potássio, a 25°C.....	39
Tabela 5 -	Comprimento das linhas de amarração (CLA) para os sistemas PEG 1500 (g/mol), sais e água.....	42
Tabela 6 -	Inclinação das linhas de amarração (ILA) para os sistemas PEG 1500 (g/mol), sais e água.....	41
Tabela 7 -	Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados da caseína.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares.....	28
Figura 2 -	Diagrama de equilíbrio de fase para o sistema contendo PEG 1500 (g/mol) + tartarato de sódio de potássio + água, a 25°C.....	39
Figura 3 -	Diagrama de equilíbrio de fase para o sistema contendo PEG 1500 (g/mol) + fosfato de sódio + água, a 25°C.....	39
Figura 4 -	Porcentagem de inibição sobre a ECA por tempo de hidrólise.....	43

LISTA DE SÍMBOLOS

- SAB's – sistemas aquosos bifásicos
- PEG – polietilenoglicol
- PA – pressão arterial
- HA – hipertensão arterial
- ECA – enzima conversora da angiotensina
- CN – caseína
- K_p – coeficiente de partição
- HHL – hipuril-histidil-leucina
- LA – linha de amarração
- ELL – extração líquido-líquido
- TLL – tielines-comprimento da linha de amarração
- ILA – inclinação da linha de amarração
- PBAs – peptídeos biologicamente ativos

SUMÁRIO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB.....	1
INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVO GERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1. LEITE.....	16
1.2 PROTEÍNAS DO LEITE.....	16
1.3 CASEÍNA.....	17
1.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS E BIOATIVOS DA CASEÍNA.....	17
1.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS LÁCTEOS.....	19
1.6 PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVOS.....	20
1.7 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS.....	21
1.7.1 NATUREZA DA ENZIMA.....	22
1.7.2 TRATAMENTO TÉRMICO DO SUBSTRATO.....	23
1.7.3 RELAÇÃO ENZIMA: SUBSTRATO.....	23
1.8 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.....	23
1.8.1 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	24
1.8.1.1 DIAGRAMA DE FASES.....	25
1.8.1.2 VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A PARTIÇÃO EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	26
1.8.1.3 CONSTITUINTES DAS FASES.....	27
1.8.1.3.1 POLIETILENOGLICOL.....	27
1.8.1.3.2 SAIS.....	27
1.8.1.4 DISTRIBUIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	29
3.1.1 REAGENTES.....	29
3.1.2 Os EQUIPAMENTOS UTILIZADOS FORAM:.....	29
3.2 METODOLOGIA.....	30
3.2.1.1 CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE.....	30
APÊNDICE 1.....	51
1.1 INTRODUÇÃO.....	52
1.2.1 CASEÍNAS AS1 E AS2.....	54
1.2.2 β -CASEÍNAS.....	56
1.2.3 K-CASEÍNAS.....	58
1.2.4 MICELAS DE CASEÍNA.....	60
1.3 MÉTODOS PARA A SEPARAÇÃO DAS CASEÍNAS E DO SORO.....	62
1.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS E BIOATIVAS DA CASEÍNA.....	63
1.4 APLICAÇÕES DA CASEÍNA NA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	65

INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza e o único que satisfaz as necessidades dos recém-nascidos de sua espécie, nos primeiros meses de vida. Apresenta-se como uma emulsão em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase dispersa é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura (SGARBIERI, 2005).

As proteínas do leite compreendem a Caseína, e algumas Albuminas, e globulina. As caseínas compreendem aproximadamente 80 a 85% das proteínas do leite (cerca de 28 g.L^{-1}), sendo que a fração caseínica consiste de quatro grupos principais de proteínas α -, β -, κ - e γ -caseína. A proporção entre os diversos tipos é determinada geneticamente, porém, geralmente, não se encontra grande variação no perfil de caseína do leite bovino de diferentes fontes. Pode-se extrair a caseína pela precipitação natural, acidificação do meio e pela coagulação catalisada por enzimas (coalhos). A relevância industrial da caseína está na fabricação de queijos e de caseinatos, que são importantes ingredientes para indústrias de formulação. As caseínas vêm sendo utilizadas como ferramenta no combate de algumas doenças degenerativas (FOX & MCSWEENEY, 1998).

As doenças cardiovasculares são umas das principais causadoras de óbito na população brasileira, há mais de 30 anos. Dentre essas doenças, a hipertensão é comum, em todo o mundo, sendo responsável por altos índices de morbimortalidade entre os idosos. A hipertensão arterial é uma doença crônica degenerativa que atinge de 6% a 8% das crianças, cerca de 20% dos adultos e 65% dos idosos. Trata-se, portanto, de um problema de saúde pública, muitas vezes, assintomático, o que faz com que as pessoas não procurem o tratamento necessário (KIM *et al.*, 2001). Por conseguinte, estudos que envolvam a obtenção e caracterização de substâncias com atividade anti-hipertensiva são necessários para auxiliar na obtenção de novas drogas que possam se adequar ao tratamento dessa doença cardiovascular. Alguns peptídeos bioativos derivados de proteínas do soro de leite têm sido apresentados como potenciais agentes anti-hipertensivos (NURMINEN *et al.*, 2000).

Após a hidrólise das proteínas para a obtenção de tais peptídeos, é necessário proceder a sua separação. Uma técnica com potencial para a separação de biocompostos é a extração líquido – líquido, usando sistemas aquosos bifásicos (SAB's). Estes sistemas são formados ao misturar duas soluções aquosas de polímeros de cadeia flexível ou de um polímero e de um sal (como fosfato de potássio, fosfato de sódio etc). O material a separar se distribui entre as duas fases aquosas do sistema e o grau de separação é quantificado por meio do coeficiente de partição (k). Este

coeficiente é função de uma série de variáveis experimentais como: pH, temperatura, presença de sais, massa molar e concentração dos polímeros que formam as fases, bem como das características da proteína. Assim, por meio do controle dessas variáveis, pode-se separar a proteína de interesse (ALBERTSSON, 1986). Esses sistemas são adequados à separação de materiais biológicos, uma vez que as fases contêm um elevado teor de água, entre 70 e 90%, o que propicia um ambiente adequado para a partição de biomoléculas (COIMBRA *et al.*, 2003). São então capazes de promover a partição de solutos em um meio pouco agressivo, de forma que as substâncias como macromoléculas, partículas virais, fragmentos de células ou mesmo organelas celulares, possam ser particionadas e purificadas sem perda de atividade biológica, tem baixo custo e facilidade de aplicação em grande escala.

No presente estudo, será avaliado a hidrólise por via enzimática da caseína do leite para obtenção de peptídeos bioativos, com propriedade anti-hipertensiva, além de estabelecer a constituição dos sistemas aquosos bifásicos mais adequados à separação destes peptídeos hipotensivos, bem como, determinar dados do coeficiente de partição dos peptídeos.

OBJETIVO GERAL

Partição de peptídeos bioativos de hidrolisados da caseína láctea, com função anti-hipertensiva, usando a extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Hidrolisar por via enzimática a caseína do leite para obtenção de peptídeos bioativos, com propriedade anti-hipertensiva.

Determinar dados de atividade inibitória da ECA, das frações do hidrolisado da caseína bovina, em diferentes tempos de hidrólise.

Estabelecer a constituição dos sistemas aquosos bifásicos mais adequados à separação de peptídeos hipotensivos em função do tipo de sal, da concentração de polímero e de sal, a 25°C.

Determinar dados do coeficiente de partição do peptídeo, em diferentes sistemas aquosos bifásicos, formados por PEG e diferentes sais.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Leite

O leite é o produto da secreção da glândula mamaria de fêmeas mamíferas domesticadas pelo homem. Este processo de domesticação e início da utilização do leite animal, principalmente o de origem bovina, data aproximadamente 5.000 A.C.. A partir de então, o Leite tem sido considerado, ao longo do tempo, um alimento por excelência para utilização pelo homem (LOURENÇO, 2000).

Apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura. O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas (SGARBIERI, 2005).

O mais importante é que o leite é um alimento de fácil acesso, sendo possível a chegada de nutrientes para todas as camadas sociais, inclusive aqueles de renda mais baixa, levando saúde e alimentação saudável para todas as pessoas.

1.2 Proteínas do Leite

Um dos componentes mais nobres do leite - a proteína - é de reconhecido valor nutricional tanto pelo alto teor de aminoácidos essenciais quanto pela sua alta digestibilidade. O papel das proteínas na alimentação é importante tanto no crescimento quanto na manutenção do corpo humano; é material básico de todas as células e chega a constituir $\frac{3}{4}$ da matéria viva animal. Das 57,5 g./dia de proteína, em média, são necessárias para uma pessoa adulta, dois copos de leite de vaca (equivalentes a 500 ml/dia) que suprem 30,43% da quantidade recomendada, sem considerar os demais nutrientes fornecidos (LOURENÇO, 2000).

O leite contém dois grandes grupos proteicos, as caseínas e as proteínas do soro, que apresentam diferentes estruturas e propriedades biológicas. Caseínas (α_1 , α_2 , β e κ) compõe aproximadamente 80% do total de proteína do leite de vaca. E sabemos que atua como carreadora de minerais como cálcio, zinco, cobre, ferro e íons fosfato. Além disso, são percussoras de muitos peptídeos bioativos. As proteínas do soro correspondem a 20% do total proteico do leite de vaca, e

representam uma excelente fonte de proteínas funcionais e de alto valor nutricional. Dos 20% das proteínas do soro, de 70-80% correspondem às proteínas globulares α -lactoalbumina e β -lactoglobulinas. Outros compostos incluem as imunoglobulinas (Igs), glicomacropéptídeos, albumina do soro, lactoferrina, proteoseptonas e numerosas enzimas (FOX, 2009).

1.3 Caseína

As caseínas são fosfoproteínas precipitadas do leite em pH 4,6 a 20 °C. Compreendem cerca de 80% das proteínas totais do leite (WONG *et al.*, 1996). As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas α , β , κ e γ , sendo que as caseínas α formam uma família de proteínas com características diferentes (α_{s0} a α_{s5}). Dentro de cada grupo de caseínas, aparecem ainda variantes genéticas. As variantes genéticas são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na sequência primária da cadeia polipeptídica (SGARBIERI, 2005).

Em razão da composição e da sequência de aminoácidos característicos, as caseínas α e β apresentam estruturas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária, estruturas em α -hélice e em conformação β (folhas β). Essa característica estrutural das caseínas, estrutura relativamente aberta e flexível, deve-se ao elevado teor de prolina (Pro), uniformemente distribuída ao longo da cadeia polipeptídica. A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, particularmente a α -hélice, promovendo uma estrutura bastante randomizada e com baixo grau de estrutura secundária. Em contrapartida, as estruturas terciárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas. Cálculos teóricos mostram que metade C-terminal de α_{s2} -caseína, provavelmente, tem uma conformação globular (isto é, uma estrutura compacta contendo algumas α -hélices e folhas- β), enquanto que a região N-terminal, provavelmente, constitui uma estrutura randômica. Cálculos teóricos sugerem que o β -caseína poderia ter 10% de seus resíduos em hélices, 17% em folhas- β e 70% em estruturas desordenadas. A κ -caseína parece ser a mais bem estruturada das caseínas, talvez com 23% de seus resíduos em α -hélices, 31% em folhas- β e 24% em β -curvas (FOX & MCSWEENEY, 1998, SGARBIERI, 2005).

Como citado anteriormente, as caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfato, ligados à serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfifílico). Como resultado, as caseínas são mais suscetíveis à proteólise e difundem-se mais rápida e fortemente em interfaces do que as proteínas do soro de leite. A caseína κ apresenta-se mais hidrofílica apesar de apresentar apenas um radical fosforilserina, por possuir carboidrato na

molécula (glicopeptídeo), caracterizando-se como uma P-glicoproteína (WONG *et al.*, 1996, SGARBIERI, 2005).

1.4 Propriedades funcionais e bioativos da caseína

O leite contribui para satisfazer em grande parte as necessidades do organismo em relação ao consumo de cálcio, fósforo, proteínas e vitaminas. As proteínas do leite têm grande importância na nutrição humana, apresentando um valor nutricional proteico elevado, com proteínas de boa digestibilidade e aminoácidos disponíveis. Possuem também aminoácidos essenciais nas proporções requeridas para o crescimento e manutenção do organismo humano (FOX, 2009).

As proteínas do leite, especificamente as caseínas, apresentam um grande potencial industrial, sendo utilizadas em diferentes formulações, por apresentarem excelentes propriedades funcionais, como solubilidade, estabilidade da emulsão, retenção de água e adesão, entre outras. Outro atributo fundamental é a estabilidade térmica durante o processamento, que pode ser exemplificado pela resistência térmica da caseína do leite à pasteurização e ao tratamento UHT. São utilizadas também como agentes espumantes e gelificantes. Algumas aplicações de propriedades funcionais da caseína em alimentos são listadas na Tabela 1.

A caseína tem ainda uma série de outras aplicações não alimentares como nas indústrias de papéis, cola e adesivos, tintas e vernizes, têxtil e indústria de couros. Também é utilizada em dietas e produtos médicos específicos como: alimentos infantis, alimentação intravenosa, formulações alimentares especiais, preparações de remédios, cosméticos etc. (SGARBIERI, 1996).

Tabela 1: Propriedades funcionais da caseína e suas aplicações em alimentos.

Propriedade	Aplicação
Emulsificação	Pães, biscoitos, sobremesas, carnes.
Hidratação	Carnes, massas (pão, bolo), doces.
Viscosidade	Sopas, molhos, sobremesas.
Gel	Carnes, bolos, queijos.
Espuma	Sorvetes, produtos lácteos.
Coesão	Carnes, pastas.
Solubilidade	Bebidas

Fonte: MUIR, 1998

Além disso, o leite contém uma complexa mistura de espécies bioativas, que conferem a ele substâncias moduladoras das funções digestivas e intestinais, hormônios e fatores de crescimento capazes de influenciar no desenvolvimento do trato gastrintestinal, além de imunorregulação e modulação da microflora intestinal. Várias destas propriedades do leite são atribuídas às proteínas e peptídeos secretados pela glândula mamária. A bioatividade de diversas proteínas do leite é latente,

ou seja, incompleta ou ausente na proteína nativa. E somente durante a digestão proteolítica das proteínas nativas é que são liberadas suas frações peptídicas ativas. Estes peptídeos bioativos podem ser formados durante o processo alimentar, quando primeiramente são liberados, após hidrólise proteolítica exercida pelas enzimas digestivas, para posteriormente exercerem seu potencial de regular vários processos no corpo humano (MEISEL, 1997).

Desde 1979, diversos autores têm descrito peptídeos bioativos originários de proteínas do leite (MEISEL, 1997), que são capazes de exercer efeito opioide, antitrombótico e anti-hipertensivo, imunomodulação e propriedades de utilização mineral.

1.5 Atividades biológicas dos peptídeos lácteos

Peptídeos biologicamente ativos (PBAs) ou bio-funcionais foram definidos como peptídeos com atividade similar a uma droga ou hormônio que, eventualmente, modulam a função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo, levando a indução de respostas fisiológicas (MEISEL, 1997).

Além de suprir aminoácidos e energia, que são essenciais para o crescimento e manutenção do organismo, as proteínas dos alimentos representam importante fonte de peptídeos biologicamente ativos, que podem desempenhar funções diversas, como moduladores de vários processos corporais (MEISEL, 1997; LI *et al.*, 2004).

Os PBAs contêm de 3 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula e, normalmente, são inativos dentro da sequência da molécula (LI *et al.*, 2004).

Estudos têm identificado um grande número de sequência de PBAs nas proteínas do leite, além das condições para sua liberação. Devido ao grande número de PBAs codificados em sua região primária, as proteínas do leite são consideradas, no momento, as principais fontes conhecidas de uma variedade de PBAs (MEISEL, 1997). Muitos destes PBAs possuem propriedades biológicas específicas que fazem desses componentes potenciais ingredientes de alimentos promotores de saúde. Peptídeos derivados da hidrólise da β -caseína podem atuar no sistema imunológico, estimulando a proliferação de linfócitos humanos e a atividade fagocitária dos macrófagos. Os caseinofosfopeptídeos, também derivados da hidrólise das caseínas, podem formar sais organofosfato solúveis e atuar como carreadores de diferentes minerais, especialmente cálcio. Ao lado dos caseinofosfopeptídeos, há também os peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana, isolados da lactoferrina, e os peptídeos que exercem efeitos antitrombóticos, derivados da κ -caseína (MEISEL, 1997).

Além dos estudos envolvendo identificação e condições para a liberação dos PBAs, há também estudos mostrando que estes peptídeos exercem várias atividades biológicas “*in vitro*” e “*in vivo*” e que alguns deles possuem propriedades multifuncionais, “*in vitro*” por hidrólise enzimática das proteínas do leite, bem como durante o processamento de derivados do leite como, por exemplo, durante a produção de queijos (KORHONEN & PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2004). Por administração oral, dependendo da sequência de aminoácidos, os PBAs podem afetar os principais sistemas corpóreos - cardiovascular, digestivo, imune e nervoso.

As atividades descritas para esses peptídeos são diversas e incluem atividade opiácea, imunomoduladora, antimicrobiana, antitrombótica, quelante de minerais e anti-hipertensiva, entre outras.

1.6 Peptídeos anti-hipertensivos

A hipertensão arterial sistêmica é, atualmente, considerada uma das mais sérias doenças crônicas, por estar relacionada ao aumento significativo do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KIM *et al.*, 2001). Estima-se que 22% a 68% da população adulta mundial apresentem hipertensão arterial (HA). No Brasil, na última década, foram realizados diversos inquéritos populacionais em amostras representativas, que indicam variações na prevalência de HA entre 22% e 44% (FUCHS *et al.*, 2004).

Além de apresentar alto custo social, respondendo por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e de absenteísmo no trabalho, a HA é uma das mais importantes causas de morbi-mortalidade universal, sendo responsável pela redução da expectativa e qualidade de vida (JNC 6, 1997).

A pressão arterial (PA) é regulada por vários sistemas inter-relacionados. Os rins têm um papel essencial durante o controle a longo prazo da pressão, através do sistema rim-líquidos corporais, ou seja, quando o corpo tem líquido extracelular em excesso, a PA se eleva provocando um efeito direto sobre os rins que excretam líquido e sódio, fazendo com que a PA volte ao normal. Ao passo que, se a pressão estiver abaixo do normal, haverá um aumento na reabsorção de sódio e na retenção de fluidos (GUYTON e HALL, 2001).

Os rins também controlam o sistema renina-angiotensina. A renina é uma enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa nas células justaglomerulares dos rins. Quando a PA cai, ocorre a liberação da renina para a corrente sanguínea, resultando em uma quebra de seu substrato natural, o angiotensinogênio, e a liberação da angiotensina I (decapeptídeo). Após a formação desse peptídeo, dois de seus aminoácidos são removidos para formar a angiotensina II.

Essa reação é catalisada pela enzima conversora da angiotensina (ECA), presente no endotélio dos vasos pulmonares. A angiotensina II é um hormônio vasoconstrictor que contribui para o aumento da resistência periférica e também atua sobre as glândulas supra-renais, estimulando a secreção de aldosterona que aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais e excreção de potássio (GUYTON e HALL, 2001).

Peptídeos inibidores de ECA atuam no controle da pressão arterial alta por meio da dilatação dos vasos sanguíneos e de seu efeito sobre o volume de sangue. Sendo que os primeiros derivados de proteínas alimentares foram descritos por OSHIMA *et al.*, (1979) que os isolaram a partir da gelatina hidrolisada com colagenase (clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3). A partir de então, houve um crescente interesse no desenvolvimento de métodos para isolar peptídeos com atividade anti-hipertensiva, derivados de proteínas alimentares, como MARUYAMA e SUZUKI (1982) que testaram caseína intacta e seu hidrolisado triptico, entretanto, apenas este último inibiu a ECA. Dando sequência a estes estudos, MARUYAMA *et al.* (1985) submeteram os hidrolisados de caseína a uma digestão adicional com uma endopeptidase prolina-específica, extraída do *Flavobacterium meningosepticum*, obtendo um heptapeptídeo bem mais potente. A literatura também mostra que inibidores eficientes da ECA têm sido isolados a partir dos hidrolisados de pescado de peixe (FUJITA *et al.*, 1995); gelatina (KIM *et al.*, 2001); soja (GIBBS *et al.*, 2004); trigo (MATSUI *et al.*, 1999); grão-de-bico (YUST *et al.*, 2003); e, principalmente, a partir das proteínas do leite, nas quais a capacidade de inibir a ECA foi demonstrada a partir de caseína (MAENO *et al.*, 1996; TAUZIN *et al.*, 2002) de proteínas do soro (NURMINEN *et al.*, 2000; HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2002; SIPOLA *et al.*, 2002b), de proteínas do plasma (HYUN & SHIN, 2000); de produtos fermentados (HATA *et al.*, 1996), e da maturação de queijos (ABUBAKAR *et al.*, 1998; GÓMEZ-RUIZ *et al.*, 2002; HAILESELASSIE *et al.*, 1999).

1.7 Hidrólise de proteínas

As técnicas envolvendo modificações químicas das proteínas têm dado lugar aos métodos enzimáticos pelo fato das hidrólises ácidas e alcalinas serem totalmente inespecíficas e destruam aminoácidos como o triptofano, o que compromete o valor nutricional da proteína. A catálise enzimática apresenta vantagens como o uso de condições brandas de processamento, a possibilidade de recuperação do catalisador e o emprego de enzimas com especificidade conhecida, resultando em produtos com maior solubilidade, estabilidade térmica e precipitação (GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994). Essas modificações podem ocorrer *in vitro* ou *in vivo* (SGARBIERI, 1996).

O uso de enzimas na manipulação de proteínas garante maior especificidade, controle e segurança nos hidrolisados obtidos do que a utilização de meios químicos. A hidrólise enzimática

de proteínas produz peptídeos com pesos moleculares variáveis e alterações na estrutura nativa da proteína. Previne reações indesejáveis devido à sua especificidade de ação, utiliza condições moderadas de tratamento, menor energia no processo, sendo possível sua inativação após o uso. Os hidrolisados obtidos por via enzimática, geralmente, apresentam menor conteúdo de sais do que os obtidos por hidrólise ácida ou alcalina (GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994).

Como resultado da hidrólise, há aumento na solubilidade das proteínas, melhoria das propriedades interfaciais e redução na viscosidade. Além disso, como as enzimas podem ser empregadas geralmente em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED, 1975).

A maioria dos peptídeos derivados de caseína que apresentam atividade biológica é produzida *in vitro* pelo uso de proteinases pancreáticas, especialmente tripsina. Combinações de endoproteinases também podem ser utilizadas, incluindo quimotripsina, pepsina, termolisina, pancreatina, carboxipetidase, entre outras. Essas enzimas podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal (CÂNDIDO, 1998).

A qualidade e as características finais do hidrolisado proteico dependem de vários fatores que devem ser controlados para se alcançar os resultados desejados, entre eles encontram-se a natureza e a associação de enzimas, pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato e inativação enzimática ao final do processo (SILVESTRE *et al.*, 1994b; CÂNDIDO, 1998).

1.7.1 Natureza da enzima

A escolha da enzima proteolítica é muito importante, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos (HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

A tripsina é uma enzima pancreática liberada no intestino, onde hidrolisa ligações peptídicas em que o grupo carbonila é dado por Lys ou Arg (LEHNINGER, 1991). É a enzima mais amplamente utilizada para a hidrólise de caseína, que visa à formação de peptídeos inibidores da ECA (MARUYAMA *et al.*, 1985, 1987a e b). Segundo FITZGERALD e MEISEL (2000), os peptídeos produzidos pela tripsina caracterizam-se pela presença na porção C-terminal de resíduos de lisina e arginina que, segundo estudos sobre estrutura e atividade da ECA, contribuem substancialmente para a potência inibitória dos peptídeos. Entretanto, outras enzimas e várias combinações enzimáticas de proteinases – incluindo alcalase, quimiotripsina pancreática e pepsina, assim como

enzimas de fontes bacterianas e fúngicas – têm sido utilizadas para gerar peptídeos bioativos (PIHLANTO- LEPPÄLÄ, 2001).

A casoquinina engloba um conjunto de peptídeos liberados pela ação da tripsina sobre α 1-CN e β -CN. São os fragmentos de f (23-27) (α 1-casoquinina-5), f (23-34) (α 1-casoquinina-10), f (28-34) (α 1-casoquinina-7), f (91-92) (α 1-casoquinina-2), f (194-199) (α 1-casoquinina-6), f (177-183) (β -casoquinina-7) e f (193-202) (β -casoquinina-10) (ARIYOSHI, 1993).

1.7.2 Tratamento térmico do substrato

A influência da temperatura na hidrólise enzimática pode ser observada em três etapas distintas, a saber: no pré-tratamento do substrato, durante a reação hidrolítica e na interrupção desta reação (BIASSUTI *et al.*, 2006).

O pré-tratamento do substrato pelo calor pode influenciar no grau de hidrólise devido à desnaturação proteica. Este procedimento provoca uma modificação da estrutura tridimensional da proteína, agindo sobre suas ligações fracas, as quais são responsáveis pela conformação nativa, aumentando a exposição das ligações peptídicas (estrutura primária), melhorando, assim, a acessibilidade do substrato às enzimas (SCHMIDT & MARKWIJK, 1993).

Com relação ao efeito da temperatura durante a reação enzimática, sabe-se que cada enzima apresenta o seu valor ótimo de atuação, o qual é interpretado pela avaliação da curva de atividade *versus* temperatura, sendo dependente da duração da reação (REED, 1975).

Segundo KILARA (1985), o tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o crescente aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa.

Esta ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores, visando à interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80°C a 90°C, por 10 a 20 min. De fato, valores mais elevados do que estes devem ser evitados para que não ocorram alterações na composição dos hidrolisados proteicos (SCHMID & POOL, 1991; SILVA *et al.*, 2005).

1.7.3 Relação enzima: substrato

A relação enzima substrato (E:S) exerce influência na velocidade da reação e no tamanho dos peptídeos produzidos no final do processo de hidrólise (RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2009).

Comparando dois hidrolisados pancreáticos de caseína, Silvestre *et al.* (1994a,b) mostraram que uma redução na relação E:S de 1:25 para 1:200 levou a um maior conteúdo de grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos) e a uma menor proporção de peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos), e aminoácidos livres. Por outro lado, o teor de di- e tripeptídeos permaneceu inalterado.

1.8 Métodos de separação de biomoléculas

O potencial para aplicações tecnológicas dessas proteínas tem estimulado o desenvolvimento de processos para sua separação e purificação, visando manter suas características funcionais inalteradas, pois os processos convencionais de separação e purificação de biomoléculas, como precipitação com sais ou extração com solventes, apresentam desvantagens associadas à desnaturação e baixa pureza. Além disso, a nível industrial, a purificação é dificultada por outros fatores como baixa concentração das proteínas e sensibilidade térmica, o que geralmente obriga o uso de técnicas de custo elevado, como processos cromatográficos. Com isso, o custo final dos processos é elevado, dificultando o acesso a estes produtos de grande aplicação nos campos alimentício e terapêutico (COIMBRA *et al.*,2003).

Assim, torna-se necessário o estudo de técnicas como a extração líquido-líquido por SAB's, que possibilitem a separação e purificação da proteína, mantendo a sua estrutura nativa.

A técnica de separação em SAB's é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala, pois permite a separação seletiva, uma baixa tensão superficial, boa biocompatibilidade, a possibilidade de aplicação em grande escala e boa relação custo-benefício. Os SAB's apresentam, ainda, outras vantagens em comparação aos métodos de separação e purificação de biocompostos, como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas, facilidade de separar materiais particulados, além de permitir a concentração da proteína de interesse em uma das fases, controlando o volume das mesmas (COIMBRA *et al.*, 2003).

1.8.1 Sistemas Aquosos Bifásicos

O uso de soluções aquosas e solventes orgânicos na extração líquido-líquido convencional não são adequados para separar compostos de origem biológica como proteínas e células, pois a estabilidade destas é baixa em solventes orgânicos. Uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em sistemas aquosos

bifásicos, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos (COIMBRA *et al.*, 2003).

Os SAB's têm adquirido importância e crescente sucesso para a concentração, isolamento e separação de proteínas. Estes sistemas são constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas as suas principais características. A alta concentração de água, de 65 % a 90 % em massa, em tais sistemas, favorece a estabilidade das proteínas durante a separação (JOHANSSON, 1998, SALABAT, 2001 e GÜNDUZ, 2004), permitem fácil aumento de escala e a reciclagem dos reagentes que formam as fases (REH *et al.*, 2002).

Beijerinck, em 1896, observou a formação de duas fases líquidas, ao misturar soluções aquosas de gelatina e agar, ou gelatina e amido solúvel. A fase inferior tornou-se rica em agar (ou amido) e a fase superior rica em gelatina. Ostwald e Hertel, em estudos posteriores, verificaram que para variadas fontes de amido, diferentes concentrações eram necessárias para a separação de fases. Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram a miscibilidade de pares de polímeros solúveis em água ou em solventes orgânicos e a ocorrência ou não de separação de fases (ALBERTSSON, 1960).

Os SAB's são formados por duas fases líquidas, que se encontram em equilíbrio termodinâmico. Resultam, por exemplo, da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, como polietilenoglicol (PEG) e dextrana, ou entre um polímero e um sal (PEG e Fosfato de Potássio) (COIMBRA, 1995; ALBERTSSON, 1986). Essas espécies químicas, quando misturadas em determinadas composições e temperaturas, dividem-se em duas fases de composições diferentes, porém, em equilíbrio termodinâmico. As fases possuem propriedades termodinâmicas intensivas distintas, como índice de refração, composição e densidade. Essas fases são separadas por uma interface, que é a região onde as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004). A purificação e resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas.

O fato de que duas ou mais fases forma-se na água com adição de polímeros incompatíveis ou de um polímero e sal é bem conhecida há várias décadas (CABEZAS, 1996).

Diversos fatores como: constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza e tamanho da partícula alvo; pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico, influencia na separação de fases em SAB's e, conseqüentemente, no processo extrativo de um determinado biocomposto (ALBERTSSON, 1986).

1.8.1.1 Diagrama de Fases

O conhecimento dos dados de equilíbrio e propriedades físico-químicas dos sistemas aquosos bifásicos é necessário para o projeto de processos de extração e para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos de transferência de massa aplicáveis na extração líquido-líquido (CARVALHO, 2004).

Para isso, são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. Os dados de equilíbrio de fases dos SAB's podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em uma temperatura e pressão fixas. Os diagramas de equilíbrio, ou diagramas de fase, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema, presentes em certas concentrações, na qual ocorre a separação de fases (COIMBRA *et al.*, 2003).

A Figura 1 apresenta um exemplo de diagrama de fases mostrando a composição das fases em equilíbrio. Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica. As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração, e qualquer ponto sobre ela representa um sistema com a mesma composição, porém, com diferentes volumes das fases superior e inferior. Para se estudar a separação de fases em SAB's, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O valor CLA pode ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação:

$$CLA = [\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2 \quad (1)$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem à diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior, expressa em % em massa, respectivamente (CARVALHO, 2004).

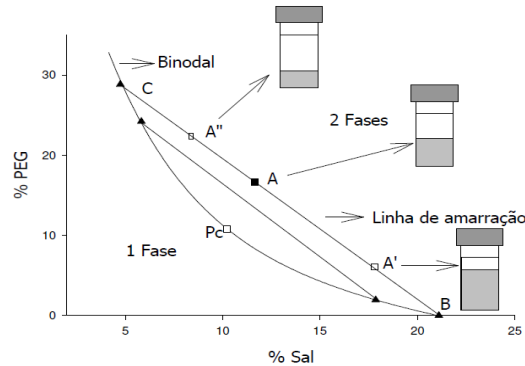


Figura 1. Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares (CARVALHO, 2004).

1.8.1.2 Variáveis que influenciam a partição em sistemas aquosos bifásicos

As variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH) ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (OLIVEIRA *et al.*, 2003; TUBIO *et al.*, 2004).

1.8.1.3 Constituintes das Fases

1.8.1.3.1 Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético neutro, de cadeia linear ou ramificada, disponível em grande variedade de massas molares, que variam de poucas centenas até milhares de dáltons. Sua fórmula estrutural é: $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. O PEG é solúvel em água e em diversos solventes orgânicos.

São fornecidos na forma de soluções incolores ou em pastas, se possuírem massas molares menores que 1.000. Os de massas molares elevadas, acima de 1.000 dáltons, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. A oxidação do PEG é detectada pela diminuição do pH, devido à liberação de grupos ácidos, que altera a coloração da solução para marrom (COIMBRA, 1995).

O PEG possui propriedades de interesse em biotecnologia:

- é solúvel em água, tolueno e em muitos outros solventes orgânicos;
- é insolúvel em éter etílico e hexano;
- pode ser usado para precipitar proteínas e ácidos nucleicos;

- forma SAB's com soluções aquosas de outros polímeros ou sais;
- é atóxico e foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA);
- é biodegradável;
- não provoca a diminuição da atividade de materiais biológicos.

A nomenclatura PEG é utilizada para compostos de baixa massa molar (abaixo 20000 g/mol). O PEG é produzido pela polimerização do óxido de etileno com um catalisador solúvel em meio ácido ou básico (mais comum). Os polietilenoglicóis com massas molares menores que 1000 g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1000 g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. PEG são higroscópicos e absorvem quantidades significativas de água, quando expostos à alta umidade. Antioxidantes são frequentemente adicionados ao PEG para evitar decomposição oxidativa (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

1.8.1.3.2 Sais

O fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3, quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L). A solubilidade em água, a 20°C, é igual a 160 g/100 mL (SIGMA-ALDRICH, 2001).

O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) também possui a coloração branca e é granuloso. Apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100 mL a 20°C. É insolúvel em álcool e possui o pH entre 4,4 e 4,7, quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L (SIGMA-ALDRICH, 2001).

Fosfato dissódico ou fosfato de sódio bibásico (ou dibásico) (Na_2HPO_4) é um sal na forma de pó branco que é altamente higroscópico e solúvel em água. É insolúvel em álcool; é comercialmente encontrado tanto como sal, na forma anidra, como na hidratada (SIGMA-ALDRICH, 2001).

Fosfato monossódico, também chamado de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), apresenta-se como cristais incolores ou pó branco. O pKa é 7.20. Insolúvel em álcool (SIGMA-ALDRICH, 2001).

Tartarato de sódio e potássio é um sal duplo, possui coloração branca e é pó. Sua fórmula molecular é $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$. A solubilidade em água, a 20°C, é igual a 1g/10mL. Tem densidade de aproximadamente 1,019 g / cm³ e um ponto de fusão de aproximadamente 170°C (SIGMA-ALDRICH, 2001).

1.8.1.4 Distribuição de Biomoléculas em Sistemas Aquosos Bifásicos

No estudo da partição, a força motriz que rege a transferência está, de alguma forma, associada à diferença de concentração entre ambas as fases (DALLORA *et al.*, 2007). Assim, o conhecimento dos diagramas de fases são também necessários para viabilizar a predição da partição das moléculas entre as fases.

A partição de proteínas entre duas fases aquosas e a distribuição de equilíbrio dos componentes dos sistemas aquosos bifásicos pode ser entendida em termos de interações moleculares na mistura. À pressão e temperatura constantes, estes diferentes tipos de interação são funções das concentrações do polímero, da água e do sal nos sistemas aquosos bifásicos, geralmente expressos em diagramas de fase (DA SILVA & LOH, 2006).

Materiais biológicos adicionados em SAB's distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre a concentração de biomoléculas na fase superior e aquela na fase inferior define o coeficiente de partição (K_p) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986):

$$K_p = \frac{[P]_{\text{sup}}}{[P]_{\text{inf}}} \quad (2)$$

em que:

$[P]_{\text{sup}}$ = concentração de equilíbrio da biomolécula particionada na fase rica em PEG (superior); e

$[P]_{\text{inf}}$ = concentração de equilíbrio da biomolécula particionada na fase salina (inferior).

Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ & KORKMAZ, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Operações e Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Reagentes e Equipamentos

3.1.1 Reagentes

Foram utilizados polietilenoglicol 1500 g/mol (SYNTH, Brasil); Fosfato de potássio (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil); Fosfato de sódio (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil); Tartarato de Sódio e Potássio (VETEC, Brasil); Enzima Conversora de Angiotensina (SIGMA, USA); Hipuril-Histidil-Leucina (SIGMA, USA); Ácido Clorídrico (VETEC, Brasil); Glicerol (VETEC, Brasil); Acetato de etila (VETEC, Brasil); Tripsina (SIGMA, USA); Caseína (SIGMA, USA); Ácido tricloroacético (SIGMA, USA); Tampão Fosfato (VETEC, Brasil); Azul brilhante de Coomassie G-250 (USB, USA).

3.1.2 Os Equipamentos utilizados foram:

- Espectrofotômetro (CARY 50, VARIAN, Austrália);
- Medidor de pH (HANNA P21, Brasil);
- Agitador magnético (FISATON, Brasil);
- Liofilizador (TERRONI LS 3000, Brasil);
- Balança analítica (M-310, DENVER INSTRUMENT, USA);
- Centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha);
- Condutivímetro (ORION, EUA);
- Banho termostático (TE-184, TECNAL, Brasil);
- Vidrarias diversas (tubos de ensaio, béquer, balões e outros);
- Sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA.

3.2 Metodologia

3.2.1 Obtenção do hidrolisado de caseína contendo os peptídeos com propriedades anti-hipertensivas

3.2.1.1 Condições de Hidrólise

Uma solução de caseína foi preparada em tampão fosfato dissódico (0,2 mol/L)- ácido cítrico (0,1 mol/L), pH 8,0 na concentração de 20 mg/mL. Foi adicionada de uma solução da enzima tripsina de pâncreas bovino. A solução foi preparada no mesmo tampão que a solução de caseína e adicionada de maneira a se obter uma relação enzima: substrato de 1:150 em massa. A hidrólise foi conduzida sob temperatura controlada, a 37°C, em banho termostático (CARREIRA *et al.*,2003).

As amostras do meio hidrolisado foram recolhidas em 1, 2, 5, 8 e 24, horas após o início da hidrólise e nomeados como H1, H2, H3, H4 e H5, respectivamente. Ácido tricloroacético foi adicionado a cada alíquota, na proporção de 10%, em relação à massa da alíquota, para que peptídeos maiores e proteína não hidrolisada fossem precipitados. Acredita-se que a adição de ácido tricloroacético inativa a enzima tripsina. As amostras foram então centrifugadas a 5000g por 10 minutos. O sobrenadante contendo os peptídeos foi recolhido e utilizado para determinar a capacidade dos mesmos de inibir a atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) (LIRA *et al.*,2010).

3.2.1.2 Determinação da atividade anti-hipertensiva dos peptídeos presentes no hidrolisado de caseína pela inibição da ECA

A atividade anti-hipertensiva dos peptídeos decorrentes da hidrólise da caseína foi avaliada pela reação entre a ECA e o substrato hipuril-histidil-leucina (HHL), cujos produtos gerados são o ácido hipúrico e o dipeptídeo His-Leu. O ácido hipúrico foi quantificado em espectrofotômetro a 228 nm, segundo CUSHMAN e CHEUNG (1971), modificado por KIM *et al.* (1999).

No preparo da amostra, foi utilizado 110 µL de solução de substrato, constituído por HHL, a uma concentração de 10 mmol/L, dissolvido em tampão fosfato potássio 0,1 mol/L e cloreto de sódio 0,3 M de pH 8,3, adicionou-se 15 µL de água deionizada. Adicionou-se 5 mU de ECA dissolvida em glicerol a 50%, incubando a 37°C, durante 30 minutos. A enzima foi então desativada pela diminuição do pH, adicionando-se 100 µL de ácido clorídrico 1 N. O meio foi submetido à agitação vigorosa durante 10 segundos. Em seguida, adicionou-se 600 µL de acetato de etila, para precipitação e separação do ácido hipúrico. O sistema foi centrifugado a 5000g, durante 10 minutos, a 25°C. Foram recolhidos 500 µL da fase orgânica. A eliminação do acetato de etila foi feita por aquecimento em banho termostático, sob temperatura controlada de 95°C, durante 10 minutos. O resíduo de ácido hipúrico presente no sobrenadante, após a evaporação do acetato de etila, foi redissolvido em 1 mL de água deionizada. Em seguida, foi medida a absorvância no espectrofotômetro. A atividade de cada amostra foi determinada em triplicata.

No preparo do controle foi utilizado 110 µL de solução de substrato, constituído por HHL, a uma concentração de 10 mmol/L, dissolvido em tampão fosfato potássio 0,1 mol/L e cloreto de sódio 0,3 M de pH 8,3; adicionou-se 15 µL de água deionizada e 100 µL de ácido clorídrico 1 N para diminuir o pH do sistema, desfavorecendo a atividade da enzima. Adicionou-se 5 mU de ECA dissolvida em glicerol a 50%, incubando a 37°C durante 30 minutos. O meio foi submetido à agitação vigorosa durante 10 segundos. Em seguida, adicionou-se 600 µL de acetato de etila para precipitação e separação do ácido hipúrico. O sistema foi centrifugado a 5000 g, durante 10 minutos, a 25°C. Foram recolhidos 500 µL da fase orgânica. A eliminação do acetato de etila foi feita por aquecimento em banho termostático, sob temperatura controlada de 95°C, durante 10 minutos. O resíduo de ácido hipúrico presente no sobrenadante, após a evaporação do acetato de etila, foi redissolvido em 1 mL de água deionizada. Em seguida, foi medida a absorvância no espectrofotômetro. A atividade de cada amostra foi determinada em triplicata.

No preparo do branco foi utilizado 110 µL de solução de substrato, constituído por HHL, a uma concentração de 10 mmol/L, dissolvido em tampão fosfato potássio 0,1 mol/L e cloreto de sódio 0,3 M de pH 8,3; adicionou-se 15 µL de amostra e 5 mU de ECA dissolvida em glicerol a 50%, incubando a 37°C durante 30 minutos. A enzima foi então desativada pela diminuição do pH, adicionando-se 100 µL de ácido clorídrico 1 N. O meio foi submetido à agitação vigorosa, durante 10 segundos. Em seguida, adicionou-se 600 µL de acetato de etila para precipitação e separação do ácido hipúrico. O sistema foi centrifugado a 5000 g, durante 10 minutos, a 25°C. Foram recolhidos 500 µL da fase orgânica. A eliminação do acetato de etila foi feita por aquecimento em banho termostático, sob temperatura controlada de 95°C, durante 10 minutos. O resíduo de ácido hipúrico presente no sobrenadante, após a evaporação do acetato de etila, foi redissolvido em 1 mL de água deionizada. Em seguida, foi medida a absorvância no espectrofotômetro. A atividade de cada amostra foi determinada em triplicata.

A percentagem de inibição da ECA (%IECA) foi então determinada pela Equação (3).

$$\%IECA = \frac{A_{Controle} - A_{Amostra}}{A_{Controle} - A_{Branco}} \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo:

$A_{controle}$: Absorvância do ácido hipúrico formado pela ação da ECA sem inibidor;

A_{branco} : Absorvância do HHL que reagiu e foi extraído com acetato de etila;

A_{amostra} : Absorbância do ácido hipúrico formado pela ação da ECA na presença das substâncias inibidoras.

3.3 Experimentos com Sistemas Aquosos Bifásicos e Quantificação do Coeficiente de Partição

3.3.1 Escolha dos Sistemas de Trabalho

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fase de sistemas compostos por polietilenoglicol, tartarato de sódio e potássio, e água, polietilenoglicol, fosfato de sódio determinados neste trabalho e também em diagramas de equilíbrio determinados por CARVALHO (2004), para sistemas compostos por polietilenoglicol, fosfato de potássio e água. A partir dos sistemas aquosos bifásicos contendo PEG de massa molar 1500 g/mol + tartarato de sódio e potássio + água, PEG de massa molar 1500 g/mol + fosfato de sódio + água e também de sistemas compostos por PEG de massa molar 1500 g/mol + fosfato de potássio + água, foi realizada a partição do hidrolisado de peptídeos da caseína, a 25°C. As análises foram conduzidas em duplicata.

3.3.2 Determinação dos Dados de Equilíbrio

3.3.2.1 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Os diagramas de equilíbrio dos sistemas aquosos bifásicos contendo polietilenoglicol (1500 g/mol) + tartarato de sódio e potássio + água e polietilenoglicol (1500 g/mol) + Fosfato de sódios + água, foram obtidos na temperatura de 25°C (precisão ± 1).

As curvas binodais para estes sistemas foram obtidas mediante a técnica turbidimétrica, segundo metodologia de Albertsson (1986), na temperatura de estudo.

Soluções aquosas estoque de PEG (50% em massa), de tartarato de sódio e potássio (40% em massa) e de fosfato de sódio (30% em massa) foram utilizadas no experimento. Cada diagrama era composto de quatro linhas de amarração.

Quantidades adequadas de PEG, tartarato de sódio e potássio e de PEG, fosfato de sódio, foram pesadas separadamente em balança analítica até que se alcançasse uma massa final de 40 g. Por exemplo, um sistema, a 25°C, contendo PEG 1500 a 50% em massa, tartarato de sódio e potássio a 40% em massa e pH = 10 foi preparado da seguinte forma: pesou-se em um tubo de centrífuga, aproximadamente 22 g da solução de PEG 1500 previamente preparada, 7 g da solução de tartarato de sódio e potássio, também previamente preparada, e água destilada e deionizada, até que se atingiu uma massa final de 40 g. Os tubos foram inicialmente agitados manual e

vigorosamente, para que todos os reagentes se misturassem. Em seguida, foram centrifugados a 720g, por 20 min, e deixados em repouso, em banho termostático a 25°C, por 20h, para que o equilíbrio fosse atingido, obtendo-se uma interface nítida com ambas as fases límpidas. As massas foram cuidadosamente anotadas para que pudesse ser realizado o balanço de massa das fases e dos componentes do sistema. Todos os dados foram obtidos em duplicata.

3.3.2.2 Coleta das Fases

Após ser alcançado o equilíbrio, as fases foram coletadas para a quantificação dos componentes, utilizando-se seringas com agulhas com 5 cm de comprimento. A fase superior foi retirada, primeiramente, com a agulha da seringa introduzida vagarosamente na fase, na qual foi deixada cuidadosamente uma camada de 0,5 cm desta fase acima da interface. Em seguida, aguardou-se uma 1h para retirar a fase inferior, a qual foi coletada introduzindo-se com cuidado uma seringa com agulha de 5 cm, que deslizou suavemente pela parede do tubo até metade da fase, para evitar a perturbação da interface, e esperando 30 min para a coleta da fase inferior. Uma pequena bolha de ar foi deixada na seringa e expelida dentro da fase inferior antes da coleta. As fases foram então armazenadas apropriadamente sob refrigeração para sua posterior quantificação dos reagentes e construção dos diagramas.

3.3.2.3 Densidade

Os dados de densidade das fases foram obtidos por picnometria. Inicialmente, o picnômetro foi calibrado com água deionizada a 25°C, temperatura na qual a densidade da água é conhecida. Este foi pesado, vazio e seco, e em seguida, com água deionizada. Com estes dados, o volume do picnômetro foi calibrado, segundo a Equação (4).

$$V = \frac{m_{pic1} - m_{pic}}{\rho_{H2O}} \quad \text{Equação (4)}$$

em que, m_{pic1} e m_{pic} correspondem respectivamente, às massas do picnômetro com água e do picnômetro vazio. O termo ρ_{H2O} corresponde à densidade da água na temperatura avaliada, 25°C.

Após a determinação do volume alíquotas correspondentes das fases superior e inferior, foram transferidas para o picnômetro, para obter o peso do picnômetro com a amostra da fase. A densidade de cada uma das fases foi calculada usando a Equação (5).

$$\rho_{fases} = \frac{m_{pic2} - m_{pic}}{V} \quad \text{Equação (5)}$$

em que, m_{pic2} refere-se à massa do picnômetro com a amostra. As análises foram realizadas em triplicata

3.3.2.4 Medida do Volume das Fases

Os tubos de centrífuga com volume de 50 mL utilizados foram inicialmente calibrados, partindo da construção de curvas analíticas do volume de água em função da altura da coluna de água em cada tubo, utilizando-se a Equação (6).

$$V = a \cdot H \quad \text{Equação (6)}$$

em que o V é o volume da respectiva fase, o a é o coeficiente angular da reta e H é a altura da respectiva fase.

A altura das fases foi medida com régua antes da coleta das alíquotas respectivas e o volume pôde ser calculado. Mediu-se a altura total das fases que correspondia à altura do fundo do tubo até a superfície da fase superior, e a altura da fase inferior, que era medida do fundo do tubo até a interface. A altura da fase superior foi obtida pela diferença entre a altura total e a altura da fase inferior. As análises foram realizadas em triplicata

3.3.2.5 Quantificação dos sais de Tartarato de Sódio e Potássio e Fosfato de Sódio

A concentração de sal em cada fase constituinte dos SAB's foi determinada usando medidas de condutividade elétrica. Inicialmente, foram obtidas duas curvas analíticas de condutividade por concentração de eletrólitos. As concentrações dos eletrólitos (tartarato de sódio e potássio; fosfato de sódio) variaram entre (1×10^{-3} e 1×10^{-4} mol/L). Para fazer a leitura do teor salino das fases, estas foram diluídas de modo que a concentração do eletrólito em solução estivesse dentro da faixa de concentração da curva analítica. As análises foram realizadas em triplicata

3.3.2.6 Quantificação de Água

A quantidade de água presente nas fases foi determinada através da técnica de liofilização. Alíquotas de aproximadamente 0,4 g foram retiradas de cada fase e transferidas para frascos de vidro tipo penicilina (15 mL), previamente pesados. As amostras foram congeladas e desidratadas no liofilizador, à temperatura de -33°C , por 24 h. Após a secagem, os fracos de vidro tipo penicilina

(15 mL) foram pesados para a determinação da massa. A diferença entre o valor da massa do frasco de vidro tipo penicilina, após liofilização, e o valor da massa do frasco de vidro tipo penicilina vazio corresponde à massa de água presente na fase. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.2.7 Quantificação de polietilenoglicol

O conteúdo de PEG, presente em cada fase, foi obtido por balanço de massa, subtraindo-se a quantidade total dos componentes adicionada da quantidade de água e de sal, quantificados no sistema.

3.3.3 Determinação de Dados de Partição dos Peptídeos nos SAB's

Os peptídeos bioativos foram incorporados nos sistemas aquosos bifásicos, compostos por PEG 1500 (g/mol) + fosfato de sódio, PEG 1500 (g/mol) + fosfato de potássio e PEG 1500 (g/mol) + tartarato de sódio e potássio. Os sistemas foram centrifugados a 860 g, por 20 minutos, e mantidos a 25°C, por 12 horas, para que fosse estabelecido o equilíbrio. As concentrações dos sais e do polímero nos sistemas foi escolhida com base nos diagramas de fases, posto que são funções dos dados de equilíbrio.

A concentração de peptídeos em cada fase foi estimada por espectrofotometria, utilizando-se o método baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, proposto por Marion Bradford em 1976. Pesou-se, inicialmente, 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em papel alumínio, que é dissolvida em 50 mL de etanol 95% v/v com agitação vigorosa. Em seguida, adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico 85% m/v, diluindo-se em 1L de água destilada e deionizada em um balão volumétrico. Filtrou-se, sob vácuo em sistema Milipore, com papel de filtro Wathman nº113, para remover insolúveis. Há a evidência visual da mudança de coloração, que passa de azul para marrom. A solução pôde ser então colocada em frasco de vidro coberto por papel alumínio para proteger o reagente de Bradford da foto-degradação. A estabilidade é garantida por meio da armazenagem em geladeira por aproximadamente um mês.

O coeficiente de partição (K_p), definido como a razão entre a concentração dos peptídeos na fase rica em PEG e a concentração dos mesmos peptídeos na fase rica em sal, foi determinado utilizando para o cálculo a equação (2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados de equilíbrio para os sistemas aquosos compostos por PEG 1500 + Tartarato de Sódio e Potássio e PEG 1500 + Fosfato de Sódio, a 25°C

As composições de equilíbrio para os sistemas estudados contendo Tartarato de Sódio e Potássio + PEG 1500 e Fosfato de Sódio + estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente, em que os dados referentes aos componentes das fases estão expressos em termos de porcentagem de massa. Quatro linhas de amarração foram determinadas para os sistemas estudados. Os dados de equilíbrio de composição de fase estão representados nas Figuras 2 e 3.

Tabela 2. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 + tartarato de sódio e potássio, a 25°C.

LA	Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior	
	Sal (massa %)	PEG (massa %)	Sal (massa %)	PEG (massa %)	Sal (massa%)	PEG (massa%)
1	22,526	16,023	8,334	33,197	37,047	0,000
2	19,050	11,991	11,183	22,278	27,633	0,000
3	19,016	15,015	9,851	26,732	30,732	0,000
4	21,016	15,626	8,678	30,104	34,841	0,000

Também foi utilizado neste trabalho o diagrama de equilíbrio, determinado por CARVALHO (2004), para sistemas compostos por PEG 1500 + fosfato de potássio, a 25°C, os quais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 + fosfato de sódio, a 25°C.

LA	Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior	
	Sal (massa %)	PEG (massa %)	Sal (massa %)	PEG (massa %)	Sal (massa%)	PEG (massa%)
1	9,9341	20,023	1,292	29,498	22,142	1,772
2	9,786	22,999	2,206	31,579	26,186	2,898
3	9,561	25,015	1,794	34,843	26,821	6,329
4	11,006	26,915	2,362	37,122	29,375	8,891

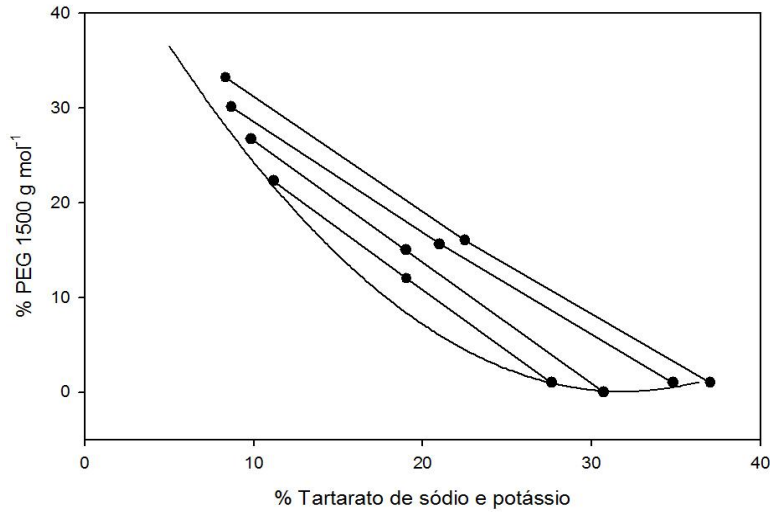


Figura 2- Diagrama de equilíbrio de fase para o sistema contendo PEG 1500 + tartarato de sódio de potássio + água, a 25°C.

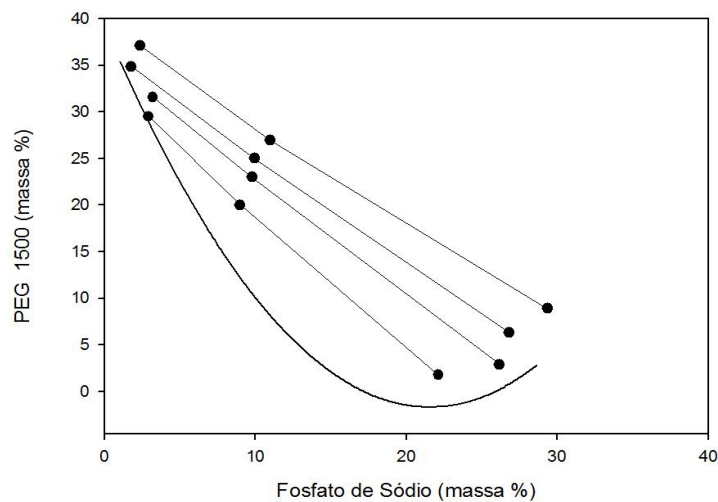


Figura 3- Diagrama de equilíbrio de fase para o sistema contendo PEG 1500 + fosfato de sódio + água, a 25°C.

Tabela 4. Dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 1500 + fosfato de Potássio, a 25°C.

LA	Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior	
	Sal (massa %)	PEG (massa %)	Sal(massa%)	PEG(massa%)	Sal(massa%)	PEG(massa%)
1	9,950	15,020	6,820	20,600	16,430	3,440
2	11,270	15,970	4,990	27,360	20,710	0,000
3	11,970	16,960	4,500	30,350	21,650	0,000
4	13,010	17,960	3,680	34,320	24,650	0,000

Para a maioria dos sistemas, a concentração de PEG na fase inferior é muito baixa, e em alguns casos, o PEG é quase que totalmente excluído dessa fase, enquanto que o comportamento contrário é observado na fase superior. Para auxiliar a análise deste efeito, serão utilizados os valores do comprimento da linha de amarração (CLA) e da inclinação da linha de amarração (ILA) para os três sistemas, Tabelas 5 e 6, respectivamente.

De acordo com Carvalho (2004), a inclinação da linha de amarração é uma medida de como as composições das fases variam com a modificação de propriedades do sistema. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da quantidade do PEG e a variação da quantidade de sal nas duas fases em equilíbrio (DP/DS).

Segundo Silva e Loh (2006), o comprimento de linha de amarração está associado à seletividade do sistema. Quanto menor o comprimento da linha de amarração, CLA, associada a uma dada composição global do sistema, mais próximo a 1 será o valor do coeficiente de partição da biomolécula de interesse, portanto, menos seletiva à extração. Entretanto, com o aumento do CLA, a transferência da proteína tende a uma das fases, isto é, o valor do coeficiente de partição torna-se cada vez mais distante de 1, para mais ou para menos. Esse comportamento é resultante do aumento na diferença da composição entre as fases que gera, conseqüentemente, o incremento das contribuições entrópicas e entálpicas na transferência da proteína para uma das fases

Dessa forma, o valor do CLA e da ILA podem ser calculados, a partir das concentrações dos componentes nas fases (CARVALHO, 2004), pelas Equações:

$$CLA = [\Delta PEG]^2 + [\Delta Sal]^2 \quad \text{Equação (7)}$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta Sal]$ correspondem à diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior, expressa em massa, respectivamente (CARVALHO, 2004).

$$ILA = \Delta PEG / \Delta Sal \quad \text{Equação (8)}$$

em que ΔPEG e ΔSal correspondem à variação da quantidade de PEG e à variação da quantidade de sal nas fases superior e inferior, expressa em % em massa, respectivamente (CARVALHO, 2004).

Tabela 5: Comprimento das linhas de amarração (CLA) para os sistemas PEG 1500, sais e água.

LA	Fosfato de Sódio	Fosfato de Potássio	Tartarato de Sódio e Potássio
1	12,60	3,87	19,26
2	13,98	9,96	7,66
3	14,39	12,15	11,50
4	15,27	16,18	15,90

Tabela 6: Inclinação das linhas de amarração (ILA) para os sistemas PEG 1500, sais e água.

LA	Fosfato de Sódio	Fosfato de Potássio	Tartarato de Sódio e Potássio
1	1,38	1,79	1,15
2	1,20	1,74	1,35
3	1,14	1,77	1,28
4	1,05	1,64	1,15

Em relação à influência da composição das fases, expresso pelo comprimento da linha de amarração, para os sistemas aquosos bifásicos formados e apresentados na Tabela 5, o aumento do CLA pode levar a um aumento do coeficiente de partição dos peptídeos da caseína, sendo possivelmente resultado de um incremento das contribuições entálpicas na transferência dos peptídeos da caseína para a fase superior. Este aumento no CLA deve-se à modificação do teor dos componentes das fases, que resulta no aumento da concentração do PEG na fase superior e diminuição da concentração do sal na fase inferior, gerado, provavelmente, pela transferência de água da fase superior para a fase inferior, que pode ser provocada tanto pelo aumento da temperatura quanto pela modificação do conteúdo de PEG ou sal nas fases do sistema.

Relacionado à influência do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio, pode ser observado, na Tabelas 6, o sistema formado por fosfato de potássio, que apresenta linhas de amarração mais inclinadas do que aquele formado por fosfato de sódio. Este comportamento pode ser explicado pelo fato do átomo de sódio possuir menor raio e maior densidade de carga do que o átomo de potássio, resultando em uma interação menos energética com o PEG. Assim, a diminuição do raio iônico do sal aumenta a inclinação da linha de amarração. Isso indica que o aumento da concentração de PEG na fase superior é maior do que o aumento da concentração de sal na fase inferior, resultando no aumento da ILA, confirmando a transferência de água da FS para a FI. Já o

tartarato de sódio e potássio obteve valores intermediários entre os de fosfato de potássio e fosfato de sódio.

Efeito similar foi verificado por Malpiedi *et al.*, (2008), ao determinar os dados de equilíbrio para sistemas compostos por PEG (1000, 2000, 4000 e 6000 g/mol), tartarato de sódio e água, a 25°C, por Oliveira *et al.*,(2009), ao determinar os dados de equilíbrio para sistemas compostos por PEG 1500 g/mol, carbonato de sódio e água, a 25°C.

Zafarani-Moattar e Gasemi (2002) investigaram a formação de fases nos SAB's, formados por PEG 6000 e os sais Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e Na_3PO_4 , todos apresentando o mesmo cátion, porém, com ânions de diferentes valências. Os autores verificaram que o aumento da carga do ânion diminui a quantidade de sal, necessária para promover a separação de fases. Tendência similar foi observada por Martins *et al.*, (2008) para SAB's formado por PEG1500 com sulfato de sódio, sulfato de lítio e sulfato de magnésio. Os autores postularam que ânions com uma maior valência são melhores agentes "salting-out" do que ânions com valência mais baixa, porque o ânion torna-se mais hidratado e, assim, diminui a quantidade disponível para hidratar o PEG.

4.2 Porcentagem de inibição da ECA, verificada para os diferentes tempos de hidrólise da caseína

A literatura descreve a obtenção de hidrolisados enzimáticos da caseína com atividade inibitória de 76%, quando foi utilizada uma associação sucessiva da pepsina com a tripsina para a hidrólise proteica (PIHLANTO-LEPPALA *et al.*, 1998). Com o emprego de várias proteases no preparo de hidrolisados de caseína, resultados entre (40-80%) de inibição da ECA foram relatados por Jiang *et al.* (2007). Os resultados de atividade inibitória encontrados no presente trabalho estão na faixa de 13,45% e 78,45%, conforme visto na Tabela 3.

A atividade inibitória dos peptídeos da caseína sobre a ECA foi determinado nas frações recolhidas em 1, 2, 5, 8 e 24 horas, após o início da hidrólise. Como apresentado na Tabela 7, os dados de atividade inibitória foram expressos em termos do percentual de inibição em cada tempo de amostragem.

Tabela 7. Atividade inibitória dos hidrolisados da Caseína sobre a ECA

Tempo (h)	Hidrolisados	Inibição sobre a ECA(%)
1	H1	47,60
2	H2	78,45
5	H3	37,22
8	H4	15,75
24	H5	13,45

ECA: enzima conversora de angiotensina.

Dentre os cinco tempos de hidrólise avaliados, o hidrolisado H2 apresentou atividade inibitória da ECA elevada, ou seja, até 78%, quando este valor é comparado com as faixas relatadas na literatura que se situam entre 60,8% e 86% (OTTE *et al.*, 2007). O hidrolisado H1 revelou atividade inibitória moderada (40-60%) e as amostras H3, H4 e H5 exibiram baixa capacidade para inibir a ECA (<20%).

A porcentagem máxima de inibição da ECA foi verificada para a amostra recolhida após o tempo de hidrólise de 2 horas, representando um valor de aproximadamente 78%, como pode ser visto na Figura 4. Acredita-se que, após este tempo de hidrólise, a concentração de peptídeos bioativos anti-hipertensivos tenha reduzido, devido contínua clivagem pela tripsina das sequências presentes no hidrolisado, tendo uma menor porcentagem de inibição em relação aos demais tempos de hidrólise avaliados. Assim sendo, a amostra recolhida após o tempo de hidrólise de 2 horas (H2), por apresentar maior inibição e ser estatisticamente diferente das demais, pode ser considerada a melhor em porcentagem da atividade inibidora da ECA, por isso, foi utilizada para a partição com SAB's.

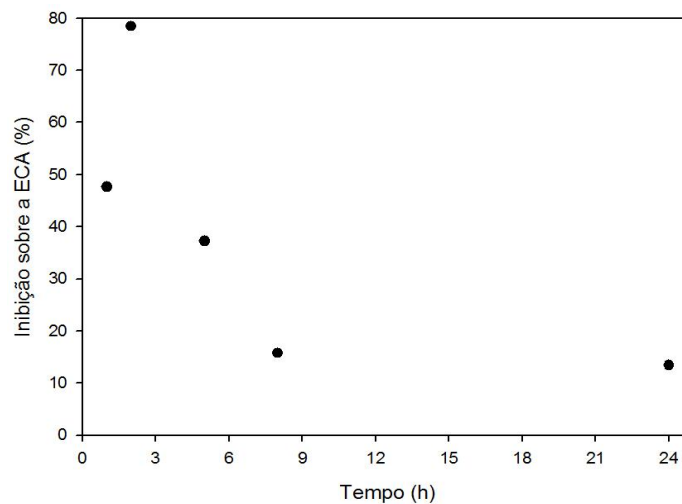


Figura 4: Porcentagem de inibição sobre a ECA por tempo de hidrólise.

4.3 Experimentos com Sistemas Aquosos Bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos contendo PEG de massa molar 1500 g/mol + tartarato de sódio e potássio + água, PEG de massa molar 1500 g/mol + fosfato de sódio + água e PEG de massa molar 1500 g/mol + fosfato de potássio + água foram usados no estudo da partição dos peptídeos presentes no hidrolisado H2 da caseína. O objetivo desta etapa foi separação e purificação dos peptídeos, visando manter suas características funcionais inalteradas.

Os resultados indicaram que, para todos os sistemas testados, compostos por PEG + tartarato de sódio e potássio, contendo diferentes concentrações do polímero e do sal, após estabelecer o equilíbrio, houve a precipitação do hidrolisado da caseína na fase inferior (rica no sal tartarato de sódio e potássio). Estes sistemas apresentavam um pH extremamente alcalino (pH 10,0), em condições normais. O valor de pH do meio influencia profundamente a solubilidade de uma biomolécula (proteína), sendo assim, este fato possivelmente pode ter provocado alterações na carga superficial total das proteínas, levando a mudanças nas interações proteína-solvente, proteína-proteína e proteína-polímero, e até mesmo a desnaturação da mesma, tendo uma maior área superficial e muito mais hidrofóbica.

O fenômeno da precipitação de uma proteína (ou hidrolisado) em solução aquosa pode ser induzido, de modo geral, pela modificação de propriedades do sistema, como temperatura, força iônica e pH. Um aumento da solubilidade pode estar diretamente relacionado ao aumento da temperatura do sistema, já que é possível pensar na solubilidade como sendo dependente das interações entre as moléculas do soluto e as do solvente. A força iônica pode ser alterada pela adição de um sal à solução (esta é a origem do termo “salting-out”), alterando a constante dielétrica do meio, favorecendo muito mais a interação eletrostática das moléculas proteicas e os novos contra-íons do que a interação dos solutos com as moléculas do solvente (ANDREWS *et al.*, 2005).

Existem substâncias capazes de induzir o aumento da solubilidade de uma macromolécula (“salting-in”) ou a diminuição da solubilidade de uma macromolécula (“salting-out”). As substâncias mais utilizadas para alterar a solubilidade são os sais e os polímeros. Quando ocorre o “salting in”, a solubilidade da proteína é favorecida porque os íons de sais interagem como grupos iônicos das moléculas de proteínas e reduzem a interação entre essas moléculas. Quando se tem, aumenta concentração de sais, ocorre a competição entre estes e as moléculas de proteínas pelas moléculas do solvente (água). A quantidade de solvente disponível torna-se insuficiente para dissolver outros solutos, o que pode levar as moléculas de sal a sequestrar as moléculas de água, constituintes da camada de hidratação de uma dada proteína e/ou peptídeo, alterando a sua estrutura conformacional, tornando-a mais estável, fato que iria favorecer a precipitação e, conseqüentemente, a sua solubilidade irá diminuir, promovendo o “salting out” (VOET & VOET, 1995). É muito provável que tenha ocorrido o efeito “salting out” com os sistemas formados por PEG + tartarato de sódio e potássio + água.

Nos experimentos com os SAB’s compostos por fosfato de potássio + PEG 1500, os valores do coeficiente de partição não foram determinados, pois os peptídeos permaneceram na fase superior do sistema (fase polimérica), em todos os sistemas analisados. Estes SAB’s apresentaram

composição de 25% do polímero e de 15%, 13% e 9% do sal. Isso pode ser devido ao fato de que estes sistemas apresentam maior número de sítios disponíveis na cadeia polimérica, em razão da hidratação do sal pela água, que podem ser ocupados pelos peptídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Vargas (2005), que verificou maior migração da caseína para a fase polimérica em SAB's compostos por PEG 1500 + fosfato de potássio, enquanto que para os sistemas formados por PEG + sulfato de zinco a proteína permaneceu em sua totalidade na fase superior.

A afinidade dos peptídeos presentes no hidrolisado da caseína pela fase polimérica se deve, entre outros fatores, à facilidade dos mesmos em associar-se a compostos de elevada massa molar. A caseína possui em sua estrutura aminoácidos apolares que estão distribuídos de forma aleatória na cadeia peptídica e que proporcionam à molécula de caseína uma hidrofobicidade média. Portanto, pressupõe-se que o hidrolisado da caseína tenha a mesma hidrofobicidade, explicando, assim, a afinidade pelos compostos de elevada massa molar, neste caso, o PEG 1500, em relação à fase inferior, rica em sal. Em adição, este comportamento também pode ser atribuído à possível presença no hidrolisado de ácidos aspártico e glutâmico da caseína que, com os grupos carboxilas livres orientados para o exterior da micela, geram cargas negativas ao redor do coloide, ionizando-o, o que faz que este seja repellido pelos íons do sal (VARGAS, 2005).

Sendo assim, a afinidade do hidrolisado da caseína pela fase superior pode ser atribuída tanto ao seu grau de hidrofobicidade quanto às cargas negativas que envolvem o mesmo, provocando sua exclusão da fase salina.

A partição de uma biomolécula para uma das fases ocorre com o intuito de diminuir a energia de Gibbs do sistema, isto é, para um estado termodinâmico de menor energia. Posto que, a partição de biomolécula é governada pela soma das contribuições de natureza entrópica e entálpica, quando o valor de uma dessas contribuições se sobrepõe a outra, o mecanismo de partição é por ela governado.

Para os sistemas compostos por PEG 1500 + fosfato de sódio, os valores do coeficiente de partição (K), definido como a relação entre a concentração dos peptídeos presentes no hidrolisado da caseína na fase superior e aquela na fase inferior, foram menores que a unidade ($K < 1$) em todos os casos. Observou-se que, quanto menor a concentração de fosfato de sódio nos SAB's, mantendo-se a concentração de PEG constante, menor foi a migração dos peptídeos do hidrolisado para a fase superior, sendo maior as concentrações dos peptídeos presentes no hidrolisado da caseína na fase inferior. A fase inferior é rica em sal e possui maior densidade numérica, assim, provavelmente, a força motriz que governou o processo de transferência do hidrolisado foi a entropia.

Segundo Duarte *et al.* (1998), pequenas concentrações salinas podem elevar a solubilidade de proteínas pelo aumento da solvatação. Devido a esta maior solvatação, menor será a quantidade de proteína disponível para interagir com a fase polimérica e, portanto, menor é a concentração da mesma verificada na fase superior. Isso pode justificar as menores concentrações de hidrolisado verificadas na fase superior em sistemas com menores concentrações salinas.

Costa (2010), estudando a partição de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos, formados por PEG (1000 e 4000) e citrato de sódio, observou que a lactoferrina migrou, preferencialmente, para fase inferior, rica em sal.

4.3.1 Efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição

Quando o peptídeo é particionado em sistemas contendo PEG e sal, o tipo e a concentração de sal têm efeito sobre as interações hidrofóbicas entre os peptídeos e o meio; os íons de sal interagem com a superfície carregada do peptídeo para formar a dupla camada elétrica. Assim, o peptídeo é desidratado, devido ao efeito de hidratação das moléculas de sal circundando o peptídeo e as zonas hidrofóbicas do mesmo são gradualmente expostas, aumentando com o incremento da concentração de sal (Da SILVA, 2007).

O efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição também foi avaliado para o SAB's, composto por PEG 1500 + fosfato de potássio e PEG 1500 + fosfato de sódio, na temperatura 25°C.

O comportamento dos diferentes tipos de sais analisados foi diferente em todos os casos. Com o fosfato de sódio, houve a distribuição dos peptídeos entre as duas fases, tendo uma maior concentração na fase inferior. Com o fosfato de potássio, os valores de partição não foram determinados, pois os peptídeos permaneceram em sua totalidade na fase superior.

Sendo assim, o sistema aquoso composto por PEG 1500 + fosfato de potássio é o mais indicado para a partição dos peptídeos presentes na hidrólise da caseína, tendo em vista a maior facilidade para recolher a fase e purificar o peptídeo.

6. CONCLUSÃO

Os peptídeos presentes no hidrolisado da caseína apresentaram, em geral, elevada capacidade em inibir a ECA.

Dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos, formados por PEG 1500 e fosfato de sódio e PEG 1500 e tartarato de sódio e potássio, foram determinados na temperatura de 25°C.

Os SAB's podem ser utilizados para o fracionamento deste hidrolisado, uma vez que os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o mesmo pode ser recuperado na fase superior do sistema, formado por PEG 1500 e fosfato de potássio, e na fase inferior no sistema, formado por PEG 1500 e fosfato de sódio.

No sistema formado por PEG 1500 e tartarato de sódio e potássio não foi possível obter uma separação, pois o hidrolisado se desnaturou ao entrar em contato com as fases.

Portanto, conclui-se que um sistema aquoso bifásico e uma técnica eficiente para o fracionamento de peptídeos da caseína bovina, com propriedades anti-hipertensivas, sendo o sistema formado por PEG 1500 e fosfato de potássio, é o mais indicado, tendo em vista a maior facilidade para recolher a fase e purificar o peptídeo.

7. REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, A. SAITO, T. KITAZAWA, H. KAWAI, Y. ITOH, T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.12, p.3131-3138, 1998.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**, 3rd Ed; John Wiley & Sons, 1960.
- ANDREWS, B. A. SCHMIDT, A. S. ASENJO, J. A. Correlation for the Partition Behaviour of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems: Effect of Surface Hydrophobicity and Charge. **Biotechnology and Engineering**, v.90, p.380-390, 2005.
- ARIYOSHI, Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. **Trends Food Science Technology**, 4, 139-144, 1993.
- BIASUTTI, E. A. R. VIEIRA, C. R. CAPOBIANGO, M. SILVA, V. D. M. SILVESTRE, M. P. C. Study of some functional properties of casein: effect of pH and tryptic hydrolysis. **International Journal of Food Properties**, 2006.
- CABEZAS, H. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**, v.B680, p.3-30, 1996.
- CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. 207f. (Tese de Doutorado).
- CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2004.
- CARREIRA, R. L. ORNELLAS, C. B. D. MORAIS, H. A. MOTTA, S. D. SILVESTRE, M. P. C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (tca) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.2, p.414-421, 2003.
- COIMBRA, J. S. R. GIRALDO-ZUÑIGA, A. D. MINIM, L. A. MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido. **Cadernos didáticos**, 95. Viçosa: UFV, 43 p.il. 2003.
- COIMBRA, J. S. R. **Desempenho de um extrator tipo Grassier na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.
- COSTA, A. R. da. **Partição de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação Mestrado. Engenharia de Processos de Alimentos, UESB, Itapetinga, 2010.
- CUSHMAN, D. W. CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v.20, p.1637-1648, 1971.

DALLORA, N. L. P. KLEMZ, J. G. D. FILHO, P. A. P. Partitioning of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbamate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 92-97, 2007.

DA SILVA, L. H. M. LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**. v. 29, p.1345-1351, 2006.

DA SILVA, C.A.S. Partição do Glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos. Dissertação Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa. 2007.

DUARTE, J. A. CARREIRA, L. R. JUNQUEIRA, G. R. COELHO, J. V. SILVESTRE, C. P. M. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 18 n. 3 Campinas, 1998.

FITZGERALD, R. J. MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensina converting enzyme. **British Journal of Nutrition**, v.84, suppl. 1, p. S33-S37, 2000.

FOX, P. F. Milk: an overview. In: *Milk proteins From expression to food*. Edited by: Abby Thompson, Mike Boland, Harjinder Singh. **Food Science and Technology International Series**, p. 1-44, 2009.

FOX, P. F. MCSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry, Ireland: **Blackie Academic & Professional**, 478p., 1998.

FUCHS, S. C. CASTRO, M. S. FUCHS, F. C. **Adesão ao tratamento anti-hipertensivo**. Hipertensão, v.7, n.3, p. 90-93, 2004.

FUJITA H. YOKOYAMA. K. YASUMOTO R. YOSHIKAWA, M. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, suppl.1, p.304-305, 1995.

GIBBS, B. F. ZOUGMAN, A. MASSE, R. MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v.37, n.2, p.123-131, 2004.

GÓMEZ-RUIZ, J. A. RAMOS, M. RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheese manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal**, v.12, n.8, p.697-706, 2002.

GONZÁLEZ-TELLO, P. CAMACHO, F. JURADO, E. PÁEZ, M. P. GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. **Biotechnology Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.

GÜNDÜZ, U. TOLGA, A. Optimization of bovine serum albumin sorption and recovery by hydrogels. **Journal of Chromatography B**, 807, 13-16, 2004.

GÜNDÜZ, U. KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 255-258, 2000.

GUYTON, A. C. HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 10ed. Philadelphia: Saunders, 1064p, 2001.

- HAILESELASSIE, S. S. LEE, B. H. GIBBS, B. F. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.8, p.1612-1617, 1999.
- HAQUE, Z.U. MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. **Food Hydrocoll.** v. 5, n. 6, p. 559-71,1992.
- HATA, Y. YAMAMOTO, M. OHNI, M. NAKAJIMA, K. NAKAMURA, Y. A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.5, p.767-771, 1996.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. RECIO, I. RAMOS, M. AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. **International Dairy Journal**, v.12, n.10, p.805-812, 2002.
- HYUN, C. K. SHIN, H. K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v.36, n.1-2, p.65-71, 2000.
- JIANG, J. CHEN, S. REN, F. LUO, Z. ZENG, S. S. Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **Journal Dairy Research.**, v. 74, p. 18-25, 2007.
- JNC 6. **The sixth report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure.** NIH publication, nov.1997.
- JOHANSSON, H. O. KARLSTRÖM, G. TJERNELD, F. HAYNES, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 3-17, 1998.
- KIM, Y. K. YOON, S. YU, D. Y. LÖNNERDAL, B. Y CHUNG, B. H. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α s1-casein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Research**, v.66, p. 431-439, 1999.
- KIM, S. K. BYUN, H. G. PARK, P. J. SHAHIDI, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skim gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n.6, p.2992–2997, 2001.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients, **Process Biochemistry**. p.149-157, 1985.
- LEDESMA, B. H. **Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos.** Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2002.
- LEHNINGER, A. L. **Principios de bioquímica.** Sao Paulo: Sarvier, 2001.
- 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, n.7, p.469- 486, 2004.

LIRA, T. B. F. BEZERRA, V. S. SILVA, F. O. DIAS, G. M. P. LIMA FILHO, J. L. PORTO, T. S. PORTO, A. L. F. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.9, p.1036-1043, 2010.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, capítulo 5, p.179-231, 2000.

MAENO, M. YAMAMOTO, N. TAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.8, p.1316-1321, 1996.

MALPIEDI, L. P. FERNÁNDEZ, C. PICÓ, G. NERLI, B. Liquid-Liquid Equilibrium Phase Diagrams of Polyethyleneglycol + Sodium Tartrate + Water Two-Phase Systems. **Journal Chemical Engineering Data**, 53, 1175-1178, 2008.

MARTINS, J. P. CARVALHO, P. C. LUIS HENRIQUE MENDES DA SILVA, L. H. M. COIMBRA, J. S. R. DA SILVA, M. C. H. RODRIGUES, G. D. MINIM, L. A. Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, Vol. 53, No. 1, 2008.

MARUYAMA, S. NAKAGOMI, K. TOMIZUKA, N. SUZUKI, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykininpotentiating activity on the uterus and the ileum of rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.5, p.1405-1409, 1985.

MANNHEIM, A. CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 1163 - 1169, 1992.

MARUYAMA, S. SUZUKI, H. A peptide Inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, n.5, p.1393-1394, 1982.

MARUYAMA, S. NAKAGOMI, K. TOMIZUKA, N. SUZUKI, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykininpotentiating activity on the uterus and the ileum of rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.5, p.1405-1409, 1985.

MATSUI, T. LI, C. H. OSAJIMA, Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin-I-converting enzyme inhibition from wheat germ. **Journal Peptide Science**, v.5, n.7, p.289-297, 1999.

MEISEL, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. **Biopolymers**, v.43, n.2, p.119-128, 1997.

MUIR, D.D.; **Milk chemistry and nutritive value**, In: EARLY R. (Ed). The technology of dairy products; second edition; London; Blackie Academic and Professional, 1998.

NURMINEN, M. L. SIPOLA, M. KAARTO, H. PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. PIOLA, K. TOSSAVAINEN, O. KORHONEN, H. VAPAATALO, H. α -Lactorphin lowers blood pressure

measured by radiotelemetry in normotensive rats and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v.66, n.16, p.1535-1543, 2000.

OLIVEIRA, G. G. G. SILVA, D. P. ROBERTO, I. C. VITOLO, M. PESSOA JR, A. Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 787-797, 2003.

OLIVEIRA, F. C. COIMBRA, J. S. R. SILVA, L. H. M. ROJAS, E. E. G. SILVA, M. C. H. Ovomuroid partitioning in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**. v. 47, p. 55-60, 2009.

OSHIMA, G. SHIMABUKURO, H. NAGASAWA, K. Peptide inhibitors of angiotensin converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. **Biochimica Biophysiology Acta**, v. 566, p.128-137, 1979.

OTTE, J. SHALABY, S. M. A. ZAKORA, M. NIELSEN, M. S. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1460-1472, 2007.

PEARCE, R. J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 50, p. 15-23, 1995.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Biocative peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.9-10, p.347-356, 2001.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. ROKKA, T. KORHONEN, H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 325-331, 1998.

RAGHAVAN, S. KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**. v. 117, p. 582-588, 2009.

REED, G. Enzymes in food processing. 2 ed. London: **Academic Press**, 573 p, 1975.

REH, G. NERLI, B. PICÓ, G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. **Journal Chemical Engineering Data**, 780, 389-396, 2002.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.

SCHMIDT, D. G. MARKWIJK, B. W. V. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 47, p.15-22, 1993.

SCHMIDT, D. G. POLL, J. K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo, Varela, 517p. 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, 2005.

SIGMA-ALDRICH. **Catálogo de 2001**

SILVA, L. H. MEIRELLES, A. J. A. Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in poly(ethylene glycol) + maltodextrin aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 279-277, 2000.

SILVA, V. D. M. DE MARCO, L. M.; DELVIVO, F. M. AGUIAR, M. Jb; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. **Alimentos & Nutrição.**, v. 16, n.1, p. 21-31, 2005.

SILVESTRE, M. P. C. HAMON, M. YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C. HAMON, M. YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.

SIPOLA, M. FINCKENBERG, P. VAPAATALO. KORPELA, R. VAPAATALO, H. NURMINEN, M. L. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. **Journal of Dairy Research**, v.69, n.1, p.103-111, 2002b.

TAUZIN, J. MICLO, L. GAILLARD. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α s2-casein. **FEBS Letters**, v.531, n.2, p. 369-374, 2002.

TUBIO, G. NERLI, B. PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.

VARGAS, J. O. M. **Partição de caseína em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol + sais de sulfato e fosfato e polietilenoglicol + maltodextrina**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2005.

VOET, D. VOET, J. G. **Biochemistry**. V. 2. New York, 1361 p, 1995.

WONG, D. W. S. CARMIRAND, W. M. PAVLAT, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** . v. 36, n.8, p.807-844, 1996.

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.80, n.1, p.1-7, 2003.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T. GASEMI, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibrium**. v. 198, p. 281-291, 2002.

APÊNDICE 1

REVISÃO: Aplicações e Estruturas da Caseína

Resumo

O presente artigo é uma revisão sobre as aplicações e estruturas (primária, secundária) das caseínas do leite bovino. As caseínas são fosfoproteínas que, em sua forma natural, apresentam-se formando agregados ou partículas (micelas) contendo as caseínas α_{S1} , α_{S2} e β , em sua parte central, e a caseína κ , que se distribui em parte no corpo da micela e em parte na superfície, conferindo-lhe estabilidade físico-química. As unidades estruturais da micela (submicelas) são unidas pela presença de fosfato de cálcio. As caseínas, particularmente α_{S1} , α_{S2} e β , são proteínas de estruturas abertas com predominância de estruturas primárias (randomizadas) e secundárias, em folhas, e muito pouca estrutura em α -hélice, o que se deve, em parte, ao elevado conteúdo de prolina distribuída regularmente em toda a cadeia polipeptídica. A estrutura aberta e flexível confere às caseínas excelente propriedade surfactante na formação de emulsões e espuma, na formação de géis e resistência térmica à desnaturação. Apresentam excelentes propriedades funcionais, incluindo solubilidade, boa capacidade de geleificação, emulsificação e espuma, excelente valor nutritivo e várias propriedades fisiológicas e bioativas importantes.

1.1 Introdução

O aumento na produção de alimentos industrializados tem criado uma demanda crescente de ingredientes que associem propriedades fisiológicas e funcionais. As frações proteicas do leite agregam atributos nutricionais, funcionais e fisiológicos, que podem ser isolados e utilizados pela indústria farmacêutica e de alimentos funcionais. Alimentos funcionais são entendidos como aqueles que apresentam componentes com potencial protetor da saúde, especialmente no que se refere às doenças crônicas não transmissíveis (SGARBIERI, 2005).

O leite é um ingrediente de importância fundamental para a indústria de alimentos. O fracionamento desta matéria-prima gera uma série de produtos indicados para inúmeras aplicações, incluindo: soro ácido, caseinatos, co-precipitados proteicos de caseína e soro, coágulo de caseína, soro doce, concentrados e isolados proteicos de soro e lactalbumina (LOURENÇO, 2000).

Um dos componentes mais nobres do leite – a proteína – é de reconhecido valor nutricional tanto pelo alto teor de aminoácidos essenciais quanto pela sua alta digestibilidade. O papel das proteínas na alimentação é importante tanto no crescimento quanto na manutenção do corpo

humano; é material básico de todas as células e chega a constituir $\frac{3}{4}$ da matéria viva animal. Das 57,5 g./dia de proteína, em média, necessárias para uma pessoa adulta, dois copos de leite de vaca (equivalentes a 500 ml/dia) suprem 30,43% da quantidade recomendada, sem considerar os demais nutrientes fornecidos (LOURENÇO, 2000).

O leite contém grande variedade de componentes proteicos mostrados na Tabela abaixo, que tipicamente podem ser divididos em duas classes, distinguidas pelas suas solubilidades no leite não-aquecido a pH 4,6 e 20°C: as caseínas (insolúveis) e as proteínas do soro (solúveis) (FOX, 2009).

1.2 Caseína

As proteínas do leite podem ser divididas em duas grandes classes, caseínas e proteínas do soro. Os dois grupos de proteínas diferem química e fisicamente e estão presentes no leite quase que em diferentes fases. A caseína é encontrada como um agregado coloidal, contendo várias moléculas de proteínas, enquanto que as proteínas do soro apresentam-se em solução (FOX, 2009).

As caseínas representam aproximadamente 80 a 85% das proteínas do leite (28 g/L), sendo um grupo heterogêneo de fosfoproteínas presentes como complexos estáveis de cálcio e fosfato que precipitam em pH 4,6 (FOX, 2009). Cerca de 95% das caseínas estão presentes em forma de micelas, formadas por subunidades de caseínas, conhecidas como submicelas, com tamanho uniforme e diâmetro entre 10 e 20 nm. As variações do tamanho, composição e massa molar da partícula das submicelas são determinadas por fatores como concentração do tipo de caseína, pH e temperatura (SGARBIERI, 1996).

Há dois processos básicos de produção de caseínas em escala industrial: a precipitação isoelétrica e a coagulação enzimática. O coágulo de caseína, obtido por enzimas, é usado principalmente na elaboração de queijos. A caseína isoelétrica, obtida pela precipitação no ponto isoelétrico (pH 4,6 a 20 °C), geralmente, é convertida para a forma de sal (caseinato). Neste caso, um álcali (sódio, cálcio ou potássio) é adicionado ao produto, que então é desidratado, e compreendem cerca de 80% das proteínas totais do leite (WONG *et al.*, 1996). As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas α , β , κ e γ , sendo que as caseínas α formam uma família de proteínas com características diferentes (α_{S0} a α_{S5}). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas. As variantes genéticas são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros, na sequência primária da cadeia polipeptídica (SGARBIERI, 2005).

Em razão da composição e da sequência de aminoácidos característicos, as caseínas α e β apresentam estruturas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária, estruturas em α -hélice e em conformação β (folhas β). Essa característica estrutural da caseína, estrutura relativamente aberta e flexível, deve-se ao elevado teor de prolina (Pro), uniformemente distribuída ao longo da cadeia polipeptídica. A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, particularmente a α -hélice, promovendo uma estrutura bastante randomizada e com baixo grau de estrutura secundária. Em contrapartida, as estruturas terciárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas. Cálculos teóricos mostram que metade C-terminal de α_{s2} -caseína, provavelmente, tem uma conformação globular (isto é, uma estrutura compacta contendo algumas α -hélices e folhas- β), enquanto que a região N-terminal, provavelmente, constitui uma estrutura randômica. Cálculos teóricos sugerem que o β -caseína poderia ter 10% de seus resíduos em hélices, 17% em folhas- β e 70% em estruturas desordenadas. A κ -caseína parece ser a mais bem estruturada das caseínas, talvez com 23% de seus resíduos em α -hélices, 31% em folhas- β e 24% em β -curvas (FOX & MCSWEENEY, 1998, SGARBIERI, 2005).

Como citado anteriormente, as caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfato ligados à serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfifílico). Como resultado, as caseínas são mais suscetíveis à proteólise e difundem-se mais rápida e fortemente em interfaces do que as proteínas do soro de leite. A caseína κ apresenta-se mais hidrofílica, apesar de apresentar apenas um radical fosforilserina, por possuir carboidrato na molécula (glicopeptídeo), caracterizando-se como uma P-glicoproteína (WONG *et al.*, 1996, SGARBIERI, 2005).

1.2.1 Caseínas α_{S1} e α_{S2}

As caseínas designadas caseínas α_S são agrupadas em duas famílias α_{S1} e α_{S2} . A α_{S1} é constituída por duas proteínas, caseínas α_{S0} e α_{S1} , cujas sequências de aminoácidos das estruturas primárias são idênticas. A família α_{S2} tem cinco membros (α_{S2} , α_{S3} , α_{S4} , α_{S5} e α_{S6}). A caseína α_{S5} é um dímero formado por α_{S2} e α_{S4} , unidas por ligação dissulfeto (WONG *et al.*, 1996; SGARBIERI, 2005).

A família α_{S1} -CN, que constitui até 40% da fração de caseína no leite bovino, consiste de um componente maior (α_{S1} com 8 sítios de fosforilação) e um componente menor (α_{S0} com 9 sítios de fosforilação). Ambas as proteínas são polipeptídeos de cadeia simples, com a mesma sequência de aminoácidos, e diferem apenas no grau de fosforilação. O menor componente contém um resíduo

de serina fosforilado adicional na posição 41. A proteína de referência para esta família é α_{S1} -CN B-8P (B e 8P significa a variante genética com 8 fosfatos), uma proteína de cadeia única, sem resíduos cistina. É constituída de 199 resíduos de aminoácidos: Asp7, Asn8, Thr5, Ser8, Ser P8, Glu25, Gln14, Prol7, Gly9, Ala9, Val11, MET5, Ile11, Leu17, Tyr10, Phe8, Lys14, His5, Trp2 e Arg6 com uma massa molecular calculada de 23,615 kDa (FARRELL *et al.*, 2004). Sua sequência primária é dada na Figura 1.

1	10	20
H-Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-		
21	30	40
Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-		
41	50	60
<u>Ser</u> -Lys-Asp-Ile-Gly- SeP -Glu- SeP -Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-		
61	70	80
Glu-Ala-Glu- SeP -Ile- SeP - SeP - SeP -Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- SeP -Val-Glu-Gln-Lys-His-		
81	90	100
Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-		
101	110	120
Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- SeP -Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-		
121	130	140
His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-		
141	150	160
Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-		
161	170	180
Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-		
181	190	199
Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH		

Figura 1. Estrutura primária da caseína α_{S1} (variante B). A α_{S1} -CN apresenta 8 variantes genéticas (A-H). (Fonte: FARRELL *et al.*, 2004).

Três regiões de sua sequência primária são formadas por resíduos com cadeias laterais apolares, regiões apolares ou hidrofóbicas, situadas entre os resíduos de aminoácidos 1 – 44, 90 – 133, 132 – 199; e uma região polar ácida em forma de alça, que contém muitos resíduos de aminoácidos com cadeias laterais carregadas, localizadas entre os resíduos 41 – 80, onde se localizam sete dos oito resíduos fosforilserina, e onde se concentra a carga líquida da proteína. As regiões apolares e a região polar interagem com as demais caseínas do núcleo das micelas: as primeiras por interação hidrofóbica e a elevada hidrofobicidade do segundo peptídeo entre os resíduos 100 – 199, responsável pela forte tendência de associação da caseína α_{S1} ; já a segunda, região polar, interage por meio de pontes de cálcio e interações eletrostáticas (SGARBIERI, 2005).

A família das caseínas α_{S2} , que constitui até 10% da fração de caseína no leite bovino, é composto por dois grandes componentes e vários componentes menores, apresentando diferentes níveis de fosforilação (10-13 fosfatos ligados) e menores graus de ligação dissulfeto intermolecular.

As formas predominantes em leite de vaca contêm uma ligação dissulfeto intramolecular e diferem apenas no grau de fosforilação. A proteína de referência para esta família é α_{S2} -CN A-11P, um polipeptídeo de cadeia única, com uma ponte dissulfeto interna. É constituída de 207 resíduos de aminoácidos: Asp4, Asn14, Thr15, Ser6, Ser P11, Glu24, Gln16, PRO10, Gly2, Ala8, Cys2, Val14, MET4, Ile11, Leu13, Tyr12, Phe6, Lys24, His3, Trp2 e Arg6 com uma massa molecular calculada de 25,226 kDa (FARRELL *et al.*, 2004). A estrutura primária desta proteína é mostrada na Figura 2.

1	10	20
H-Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val- SeP-<u>SeP</u>-<u>SeP</u> -Glu-Glu-Ser-Ile-Ile- SeP -Gln-Glu-Thr-Tyr-		
21	30	40
Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro- SeP -Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-		
41	50	60
Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly- SeP-<u>SeP</u>-<u>SeP</u> -Glu-Glu-		
61	70	80
SeP -Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-		
81	90	100
Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-		
101	110	120
Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-		
121	130	140
Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu- SeP-<u>Thr</u>-<u>SeP</u> -Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-		
141	150	160
Met-Glu- SeP -Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu- Thr -Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-		
161	170	180
Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-		
181	190	200
Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-		
201	207	
Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-OH		

Figura 2. Estrutura primária da α_{S2} -CN A-11P. (Fonte: FARRELL *et al.*, 2004).

A α_{S2} -caseína é a mais hidrofílica de todas as caseínas. Apesar de relativamente hidrofóbicos, os 47 resíduos C-terminal transportam uma carga líquida positiva no pH do leite. Por outro lado, os 68 resíduos N-terminal, mais hidrofílicos, apresentam uma carga líquida negativa no pH do leite.

A estrutura primária das α_{S2} -CN pode ser representada por quatro domínios: um domínio N-terminal hidrofílica, um domínio central hidrofóbico, seguido por outro domínio hidrofílico e, finalmente, um domínio hidrofóbico C-terminal, positivamente carregado. Esta estrutura é consistente com um comportamento de associação que é muito dependente da força iônica. A associação parece ser mais forte em torno de uma força iônica de 0,2 M, com dissociação ocorrendo em menor concentração de sal, por causa da repulsão eletrostática, e também em maior quantidade

de sal por causa da repressão da atração eletrostática, refletindo, assim, as contribuições da ambas as interações hidrofóbicas e atração eletrostática (FARRELL *et al.*, 2004).

A α_{S2} -CN é mais sensível ao Ca^{2+} do que α_{S1} -CN, com quase completa de precipitação ocorrendo em 2 mM de Ca^{2+} para α_{S2} -CN, a pH 7, enquanto que a precipitação, de α_{S1} -CN requer 6mM de Ca^{2+} (FARRELL *et al.*, 2004).

1.2.2 β -Caseínas

A família β -caseínas, que constitui até 45% da caseína de leite bovino, é bastante complexa devido à ação da plasmina protease nativa do leite. A estrutura primária da β -caseína é suscetível de hidrólise pela protease plasmina nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28 – 29, 105 – 106 e 107 – 108, produzindo fragmentos peptídicos referidos na literatura como caseínas γ , levando à formação de $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - e $\gamma 3$ -CN, que na verdade são fragmentos de β -CN, constituído de resíduos 29-209, 106-209 e 108-209, e permanecem nas micelas, além de pequenos fragmentos que se difundem para a fase líquida (soro), constituindo uma parte da fração proteose-peptona, que representa os resíduos 1-105 ou 1-107, 1-28 e 29-105. A proteína de referência para esta família, β -CN A²-5P, que consiste de uma cadeia polipeptídica com nenhum resíduo de Cys contendo 209 resíduos. É constituída por Asp4, Asn5, Thr9, Ser11, Ser P5, Glu9, Gln20, Pro35, Gly5, Ala5, Val19, MET6, Ile10, Leu22, Tyr4, Phe9, Lys11, His5, Trp1 e Arg4 com um massa molecular calculado de 23,983 kDa (FARRELL *et al.*, 2004).

A representação da sequência primária da caseína β (A²), indicando as variantes genéticas (A³, B e C) e os pontos de clivagem para a formação das caseínas γ , está ilustrada na Figura 3.

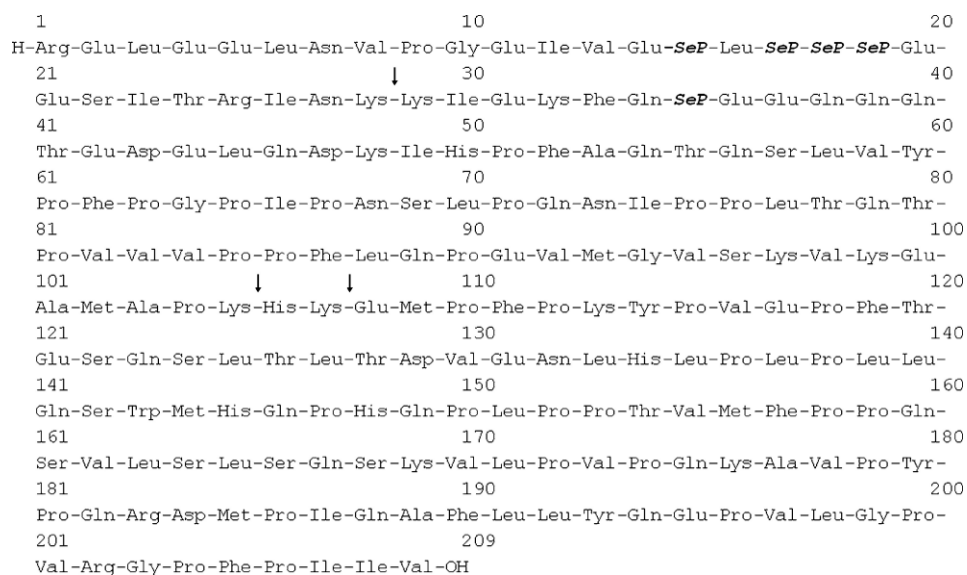


Figura 3. Sequência primária da β -caseína (A^2), ilustrando as clivagens para formação de caseínas γ . Fonte FARRELL *et al.*, 2004.

Na presença de Ca^{2+} formam suspensões coloidais ao invés de precipitarem, como as caseínas $\alpha S1$. As β -caseínas apresentam temperatura, concentrações e pH em que ocorre equilíbrio, associação–dissociação. A temperatura abaixo de $8^\circ C$ ou em valores elevados de pH, ocorre a dissociação a monômeros. Em temperaturas elevadas e pH próximo da neutralidade, ocorre a formação de polímeros em forma de contos (SGARBIERI, 2005).

A família das caseínas β é constituída de um membro principal com no mínimo sete variantes genéticas e oito pequenos fragmentos proteicos, formados por hidrólise enzimática do componente principal. A proteína principal é a mais hidrofóbica das caseínas. A parte carboxiterminal da molécula (res 136 – 209) contém muitos resíduos apolares, ao passo que a região entre os resíduos 1 a 135, com cinco resíduos fosforil, contém toda a carga líquida da proteína. Apenas os cinco resíduos aminoterminais possuem uma apreciável proporção de resíduos hidrofílicos e de resíduos com cargas elétricas. Dessa forma, os resíduos polares e apolares da estrutura primária estão agrupados em sequências localizadas em regiões distantes da cadeia. Por causa dessa distribuição de seus aminoácidos, a molécula assemelha-se a detergente aniônico, sendo um agente emulsificante eficaz. A estrutura secundária é formada de 10% α -hélice, 13% folhas β e 77% de estrutura randomizada. Esse percentual elevado de estrutura aperiódica pode ser explicado, em parte, pela distribuição uniforme de resíduos prolil (Pro) na estrutura primária (SGARBIERI, 2005).

1.2.3 κ -Caseínas

De todas as caseínas, a κ -caseína é a menos fosforilada (1P), de estrutura mais estável e mais ordenada, embora contenha muitos resíduos prolil. Possui apenas um resíduo fosforil (SerP-149), localizado no segmento glicomacropéptido (GMP). É a única caseína que não precipita na presença de Ca^{2+} , ligando dois moles de Ca^{2+} por mole de proteína, em pH neutro (KHORSHID & FATMA, 2010).

Consiste de 169 resíduos de aminoácidos: Asp4, Asn8, Thr15, Ser12, Ser P1, Pyroglu1, Glu12, Gln14, Pro20 Gly2, Ala14, Cys2, Val11, Met2, Ile12, Leu8, Tyr9, Phe4, Lys9, His3, Trp1, and Arg5, com massa molecular de 19,037 kDa (FARRELL *et al.*, 2004).

A κ -caseína sofre hidrólise por ação da quimosina (EC 3.4.23.4). A ligação sensível a hidrólise ocorre entre Phe 105 e Met 106. Os produtos da hidrólise são p- κ -caseína e macropéptido

(glicomacropéptido). A região carboxiterminal da sequência primária, solúvel na fase soro, designada glicomacropéptido (GMP), concentra os resíduos de aminoácidos ácidos e a maioria dos hidrófilos. Os resíduos de aminoácidos básicos e os apolares estão agrupados na região aminoterminal, compondo uma região apolar e insolúvel denominada para- κ -caseína (KELLEHER *et al.*, 2003).

A sequência primária da caseína κ (B), com indicação das substituições para a variante A e do ponto de clivagem (Phe 105 – Met 106) da enzima coagulante renina, está ilustrada na Figura 4.

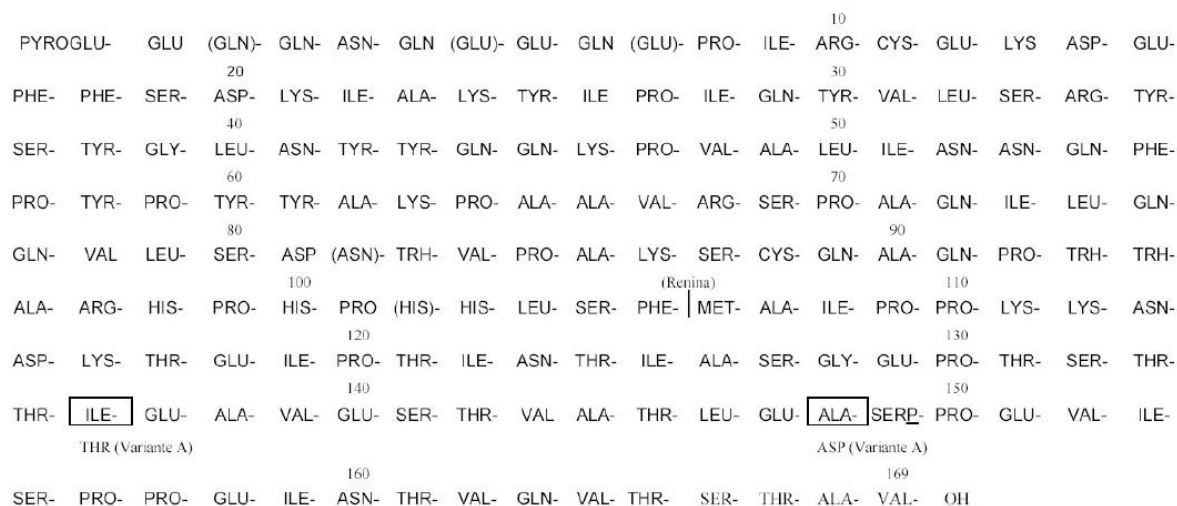


Figura 4. Sequência primária da caseína κ (B), ilustrando as substituições para a variante A e o ponto de clivagem (Phe 105 – Met 106) da enzima coagulante renina. Duas cisteínas (Res 11 e 88) e 1 SERP (Res 149). Fonte SGARIERI, 2005.

Cada monômero de κ -caseína tem massa molecular de 19 kDa, mas, no leite, as moléculas encontram-se agregadas em polímeros de massa molecular entre 60 e 150 kDa, formados pela interação das variantes genéticas A e B por ligação dissulfeto. Essa interação pode prosseguir por meio de interações não-covalentes até polímeros de massa molecular de 650 kDa. Os monômeros apresentam considerável heterogeneidade estrutural, por causa das variantes genéticas, podendo ainda apresentar diferentes conteúdos de carboidrato e de fosfato (SGARBIERI, 2005).

Essas caseínas têm os resíduos de aminoácidos dicarboxílicos localizados em sua sequência na região carboxiterminal, que é também glicosilada. Em geral, três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina ou ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136, constituem a parte glicosídica da molécula. A estrutura

secundária e/ou terciária parece ser o fator primordial na determinação dos sítios de glicosilação, sendo a única caseína glicosilada (SGARBIERI, 2005).

A κ -caseína, em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas, atua como estabilizadora dessas partículas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao Ca^{2+} por ação dos sais de cálcio do leite. A solubilidade da caseína κ não é afetada pela presença do Ca^{2+} . A região da sequência primária da para- κ -caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as caseínas αS e β , dispostas no núcleo da micela, ao passo que o glicomacropéptido (GMP), em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase soro, interagindo com a água. Essas interações da sequência primária da κ -caseína estabilizam as micelas no leite (FARRELL *et al.*, 2004; SGARBIERI, 2005).

A hidrólise enzimática que ocorre na manufatura do queijo ou o tratamento térmico em temperaturas elevadas resultam na remoção ou dissociação da κ -caseína da superfície das micelas, eliminando a estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo (SGARBIERI, 2005).

A estrutura secundária da κ -caseína é formada por cinco regiões em α -hélice (23% do total), sete regiões em folhas β (31% do total) e dez regiões em alças em conformação β (24%). A estrutura secundária do segmento para- κ -caseína é muito ordenada, sobretudo as regiões em folhas β entre os resíduos de aminoácidos 22 – 32 e 40 – 56, e contém dois resíduos cisteinil (cysSH), provavelmente, nas voltas β , suscetíveis à oxidação e à reação de intercâmbio sulfidrílo-dissulfeto (CysSH/Cys-S-S-Cys) (FOX & MCSWEENEY, 1998; SGARBIERI, 2005).

1.2.4 Micelas de caseína

No leite, as caseínas existem como grandes partículas coloidais, com diâmetro DE 50-600nm (média de aproximadamente 150 nm), chamadas micelas de caseína. Muitas das importantes propriedades tecnológicas do leite, por exemplo, sua cor branca, estabilidade térmica e coagulação, são devidas às propriedades das micelas. No leite, as micelas de caseína apresentam-se altamente hidratadas (3,7 g ou 4,4 mL de água) por grama de caseína. As micelas apresentam massa molecular da ordem de $2,5 \times 10^8$ Da. São formadas de aproximadamente 94% (p/p) de caseínas e 6% de minerais, referido coletivamente como fosfato de cálcio coloidal (FOX & BRODKORB, 2008).

Ainda há divergência entre os pesquisadores sobre a estrutura supramolecular das micelas de caseína, embora vários aspectos destes são comuns. As observações seguintes são algumas relevantes para tal modelo (WALSTRA *et al.*, 2006):

- Micrografias eletrônicas mostram partículas aproximadamente esféricas, de tamanho médio na ordem de 0,1 μm . As partículas não são completamente esféricas: eles têm uma superfície instável;
- Várias caseínas tendem a associar em pequenos agregados (4-25 moléculas, de acordo com a espécie de caseína). Em uma solução de caseína de leite ultrafiltrado (simulada), a associação ocorre também, os pequenos agregados são de composição mista. Se íons cálcio e fosfato são adicionados lentamente em pH constante para uma solução deste tipo, torna-se branco, e mostra as partículas que ficam como micelas de caseína nativa;
- A partir de determinação da composição das micelas de caseína de diferentes diâmetros, foi calculado que o núcleo de uma micela é composto de quantidades aproximadamente iguais de αs e β -caseína, com muito pouco de κ -caseína, enquanto que a camada externa parece consistir de quantidades aproximadamente iguais de κ - e αs -caseína, com muito pouco de β -caseína. A concentração de κ -caseína é proporcional à área superficial específica das micelas;
- Quase toda κ -caseína está presente sob a forma de polímeros, de 2-9 (média de cerca 6) moléculas ligadas entre si por-S-S-pontes;
- As micelas de caseína devem conter uma grande quantidade de água.

A partir dessas e de outras observações e considerações, resultou no modelo ilustrado na Figura 5. Um elemento importante é que a micela é construída de submicelas de composição mista, cada uma com um tamanho de 12-15 nm, contendo cerca de 20 a 25 moléculas de caseína. Alguns destas submicelas contêm um ou dois polímeros de κ -caseína e estão do lado de fora das micelas. As outras submicelas deverão conter nenhum ou muito pouco κ -caseína (WALSTRA *et al.*, 2006).

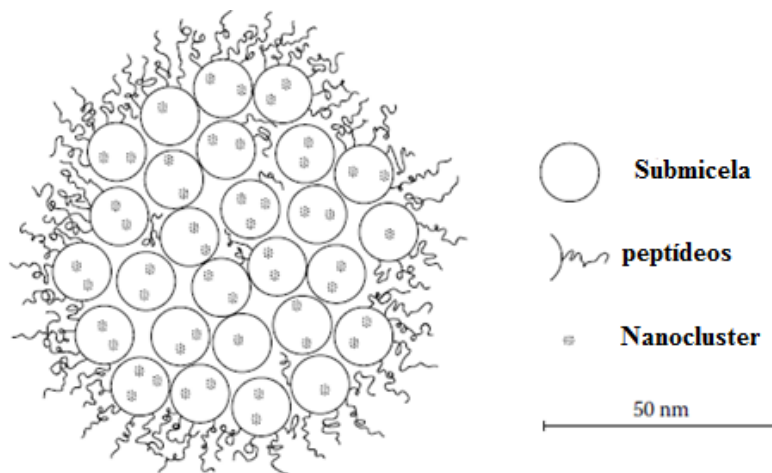


Figura 5. Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídeos de caseína κ , recobrando a superfície da micela. Fonte: WALSTRA *et al.*, 2006.

Este modelo concorda com a maioria das propriedades das micelas de caseína. No entanto, alguns pesquisadores são de opinião que a existência de submicelles é improvável, e assumem uma estrutura mais homogênea. Contudo, diversas características são geralmente aceitas. Estas incluem (WALSTRA *et al.*, 2006):

- A existência de uma camada “peluda”, que consiste no C-terminal (cerca de 75 resíduos de aminoácidos) da κ -caseína. Os pêlos são bastante hidrofílicos e são carregados negativamente, pois eles contêm também as moléculas de carboidrato da κ -caseína. A espessura da camada hidrodinâmica é cerca de 7 nm. A camada é essencial para fornecer estabilidade coloidal;
- A presença dos chamados nanoclusters de fosfato de cálcio, de cerca de 3 nm de diâmetro. Estes contêm o fosfato inorgânico e muito do cálcio das micelas, mas também o fosfato orgânico dos resíduos da SERP, e, provavelmente, alguns resíduos de ácido glutâmico. Em outras palavras, um nanocluster não é o fosfato de cálcio puro, mas também contém moléculas de proteína;
- As forças, mantendo os elementos estruturais de uma micela juntos, são, pelo menos, em condições fisiológicas, as ligações hidrofóbicas entre os grupos de proteína e ligações cruzadas entre cadeias peptídicas pelos nanoclusters. Provavelmente, ligações iônicas também estão envolvidos;
- Estudos de RMN mostraram que as moléculas de proteína em uma caseína micelar são quase totalmente imóvel, exceto para os pêlos, que irá mostrar o movimento browniano contínuo. Esta imobilidade é a curto prazo (na ordem de nanossegundos). Em prazos mais longos, as moléculas pode se mover dentro e fora de uma micela.

Nas micelas de caseína, a auto-associação molecular depende muito da temperatura do meio, do pH e da concentração de Ca^{2+} . A 4°C, se o pH natural do leite (6,68) é diminuído para 5,1-5,3, parte da caseína β dissocia-se da estrutura proteica micelar, passando para o soro. A dissociação é atribuída ao rompimento das interações hidrofóbicas intermoleculares, que são mínimas em temperaturas abaixo de 5°C. Abaixando-se ainda mais o pH, a dissociação ocorre também pela dissolução do fosfato de cálcio coloidal (SGARBIERI, 2005).

1.3 Métodos para a separação das caseínas e do soro

Existem métodos para isolamento das caseínas que podem ser aplicados em nível de laboratório. Micelas de caseína intactas, com os íons Ca^{++} associados, podem ser coletadas por centrifugação do leite desnatado em alta força centrífuga a 37°C. Contudo, cerca de 5 a 20% das caseínas mantêm-se solúveis no sobrenadante. As caseínas também podem ser separadas por

“salting out”, com sulfato de amônio a 2°C (26,4 g/100 mL de leite), precipitando-se conjuntamente pequenas quantidades de proteínas do soro. Três processos encontram aplicação industrial, a saber: a) precipitação pela acidificação com ácido orgânico ou mineral no pH 4,6 (pI), 20°C, seguido de centrifugação para a obtenção da caseína isoeletrica e de soro ácido. A caseína isoeletrica poderá ser transformada em caseinato pela ressolubilização em soluções de vários tipos de base e desidratada em “spray dryer”; b) a coagulação enzimática da caseína por preparados enzimáticos comerciais, para obtenção de coágulo e de soro “doce”. O coágulo, depois de separado do soro, é usado como matéria-prima na produção de queijos. Nesse processo, o glicomacropéptido (GMP) passa para a fase líquida (soro) e a parte restante da caseína (para- κ -caseína) fica retida no coágulo; c) o terceiro processo é baseado na separação física das micelas intactas de caseína por membranas, obtendo-se, como produto, a caseína na forma micelar e o soro natural, sem nenhuma alteração por agentes químicos ou enzimáticos (MODLER, 2000; ZINSLY *et al.*, 2001).

Os caseinatos de sódio e potássio são solúveis em pH neutro, possuem elevadas propriedades de superfície e estabilidade ao congelamento. Formam soluções de alta viscosidade, quando em concentrações acima de 10%. O caseinato de cálcio apresenta alta dispersibilidade e baixa viscosidade. O coágulo de caseína e os caseinatos de sódio e cálcio podem ser usados em produtos de panificação, alimentos infantis, alimentos para atletas, na elaboração de emulsões, coberturas, pós para bebidas, sopas e sobremesas. A utilização de coágulo de caseína e de caseinatos na elaboração de queijos leva a uma melhor hidratação e rápida dispersão dos componentes, tendo como resultado uma melhor textura do produto final. Além das aplicações alimentícias, o caseinato de sódio pode ser usado na fabricação de papéis e adesivos (KRÜGER, 2002).

Dois novos processos têm sido propostos para a desestabilização das micelas de caseína. O primeiro denomina-se crioprecipitação e tem como princípio o aproveitamento do efeito de temperaturas negativas na estabilidade micelar. O congelamento a -10°C do leite com posterior armazenamento leva ao abaixamento do pH para valores próximos a 5,8, devido à precipitação do fosfato de cálcio. O segundo processo se baseia na baixa estabilidade da caseína, quando o leite é acidificado a pH 6,0 e misturado de 10 a 15% de etanol (DAMODARAN & PARAF, 1997).

As micelas de caseína também podem ser separadas do soro pelo uso de membranas de microfiltração (MF). A microfiltração de leite integral ou desnatado em membranas com porosidade, variando de 0,1 a 0,2 μ m, permite a coleta de um permeado com composição semelhante ao soro doce, porém, mais cristalino e de qualidade bacteriológica satisfatória. Este soro doce pode sofrer purificação posterior por ultrafiltração, gerando um isolado proteico de soro com 96% de

proteínas. Como retentado se obtém o fosfocaseinato de cálcio micelar ou caseína micelar (MAUBOIS *et al.*, 2002).

1.4 Propriedades funcionais e bioativas da caseína

O leite contribui para satisfazer, em grande parte, as necessidades do organismo em relação ao consumo de cálcio, fósforo, proteínas e vitaminas. As proteínas do leite têm grande importância na nutrição humana, apresentando um valor nutricional proteico elevado, com proteínas de boa digestibilidade e aminoácidos disponíveis. Possuem também aminoácidos essenciais nas proporções requeridas para o crescimento e manutenção do organismo humano (FOX, 2009).

As proteínas do leite, especificamente as caseínas, apresentam um grande potencial industrial, sendo utilizadas em diferentes formulações por apresentarem excelentes propriedades funcionais, como solubilidade, estabilidade da emulsão, retenção de água e adesão, entre outras. Outro atributo fundamental é a estabilidade térmica durante o processamento, que pode ser exemplificado pela resistência térmica da caseína do leite à pasteurização e ao tratamento UHT. São utilizadas também como agentes espumantes e gelificantes. Algumas aplicações de propriedades funcionais da caseína em alimentos estão listadas na Tabela 1.

A caseína tem ainda uma série de outras aplicações não alimentares como nas indústrias de papéis, cola e adesivos, tintas e vernizes, têxtil e indústria de couros. Também é utilizada em dietas e produtos médicos específicos, como: alimentos infantis, alimentação intravenosa, formulações alimentares especiais, preparações de remédios, cosméticos etc. (SGARBIERI, 1996).

Tabela 1: Propriedades funcionais da caseína e suas aplicações em alimentos.

Propriedade	Aplicação
Emulsificação	Pães, biscoitos, sobremesas, carnes.
Hidratação	Carnes, massas (pão, bolo), doces.
Viscosidade	Sopas, molhos, sobremesas.
Gel	Carnes, bolos, queijos.
Espuma	Sorvetes, produtos lácteos.
Coesão	Carnes, pastas.
Solubilidade	Bebidas

Fonte: MUIR, 1998

Além disso, o leite contém uma complexa mistura de espécies bioativas, que conferem a ele substâncias moduladoras das funções digestivas e intestinais, hormônios e fatores de crescimento, capazes de influenciar no desenvolvimento do trato gastrointestinal, além de imunoregulação e

modulação da microflora intestinal. Várias destas propriedades do leite são atribuídas às proteínas e peptídeos secretados pela glândula mamária. A bioatividade de diversas proteínas do leite é latente, ou seja, incompleta ou ausente na proteína nativa. E somente durante a digestão proteolítica das proteínas nativas é que são liberadas suas frações peptídicas ativas. Estes peptídeos bioativos podem ser formados durante o processo alimentar, quando, primeiramente, são liberados, após hidrólise proteolítica exercida pelas enzimas digestivas, para posteriormente exercerem seu potencial de regular vários processos no corpo humano (MEISEL, 1997).

Desde 1979, diversos autores têm descrito peptídeos bioativos originários de proteínas do leite (MEISEL, 1997), que são capazes de exercer efeito opioide, antitrombótico e anti-hipertensivo, imunomodulação e propriedades de utilização mineral.

1.4 Aplicações da caseína na obtenção das micropartículas

No desenvolvimento de sistemas microparticulados para uma liberação modificada, o grande desafio é a manutenção da integridade da parede que controla a saída do material. Isso exige, em muitos casos, que o material usado na confecção da parede seja insolúvel ou parcialmente insolúvel.

Várias proteínas, devido às suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, funcionais, como formação de gel e emulsificação, oferecem uma boa opção de material de cobertura. A gelatina, a albumina, a caseína, proteínas do soro de leite e da soja vêm sendo estudadas como material de cobertura para microencapsulados. Além das vantagens tecnológicas apresentadas por esses polímeros, eles são componentes naturais, de consagrado uso alimentar, não sendo esperadas reações tóxicas, diferentes de alguns polímeros sintéticos que, muitas vezes, não são permitidos, ou têm seu uso limitado, devido a uma possível toxicidade (LEE & ROSENBERG, 2000).

A caseína, intacta ou modificada, vem sendo estudada como polímero formador de filmes (BULGARELLI *et al.*, 2000) para revestimento de formas sólidas e na preparação de microcápsulas (SANTINHO *et al.*, 2002).

Devido à sua natureza anfipática, ou seja, caráter anfótero (carga negativa acima do seu ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste) e por sua capacidade formadora de filme, a caseína vem sendo estudada como material para preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos, obtenção de sistemas matriciais e também na preparação de microcápsulas (SANTINHO *et al.*, 2002).

1.5 Conclusão

As caseínas apresentam um grande potencial industrial, sendo utilizadas em diferentes formulações por apresentarem excelentes propriedades funcionais, como solubilidade, estabilidades da emulsão, entre outras. Outro atributo fundamental é a estabilidade térmica durante o processamento, que pode ser exemplificado pela resistência térmica da caseína do leite à pasteurização e ao tratamento UHT. São utilizadas também como agentes espumantes e gelificantes. Este trabalho teve como objetivo apresentar informações referentes às aplicações e estruturas da caseína, que ainda não são totalmente compreendidas e discutidas.

1.6 Referências

- BULGARELLI, E. FORNI, F. BERNABEI, M. T. Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties. **International Journal Pharmaceutics**, v.198, n.2, p.157-65, 2000.
- DAMODARAN, S. PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York : Marcel Dekker, Inc., 1997.
- FARRELL , H. M. JR. JIMENEZ-FLORES, R. BLECK, G. T. BROWN, E. M. BUTLER, J. E. CREAMER , L. K. HICKS, C. L. HOLLER, C. M. NG-KWAI-HUANG, K. F. SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows ' milk – sixth revision . **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641 – 47, 2004.
- FOX, P. F. Milk: an overview. In: *Milk proteins From expression to food*. Edited by: Abby Thompson, Mike Boland, Harjinder Singh. **Food Science and Tecnology International Series**, p. 1-44, 2009.
- FOX, P. F. BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 677– 684, 2008.
- FOX, P. F. MCSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry, Ireland: **Blackie Academic & Professional**, 478p., 1998.
- KELLEHER, S. L. CHATTERTON, D. NIELSEN, K. LONNERDAL, B. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1261-1268, 2003.
- KHORSHID, M. A. FATMA, A. M. Structure of Whey Protein Consequence For Dairy Industry. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 79-84, 2010.
- KRÜGER, C. C. H. **Propriedades funcionais de concentrados protéicos de leite bovino**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 77p, 2002.

LEE, S. J. ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 33, p. 80-88, 2000.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos. Jaboticabal**, São Paulo: Edição Funep, capítulo 5, p.179-231, 2000.

MAUBOIS, J. L. LEONIL, J. SABOYA, L. V. **Milk-derived bioactive peptides: technological challenges**. *Boletim SBCTA*. Campinas, v. 36, n. 2, p. 116 – 121, 2002.

MEISEL, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, v.43, n.2, p.119-128, 1997.

MODLER, H. W. Milk processing. In: NAKAI, S. MODLER, W. (Eds.). *Food proteins: processing applications*. **Wiley-VCH, Inc.**, p.1-21, 2000.

MUIR, D.D.; **Milk chemistry and nutritive value**, In: EARLY R. (Ed). *The technology of dairy products; second edition*; London; Blackie Academic and Professional, 1998.

SANTINHO, A. J. P. UETA, J. M. FREITAS, O. PEREIRA, N. L. Physicochemical characterization and enzymatic degradation of casein microcapsules prepared by aqueous coacervation. *Journal Microencapsulation*, v.19, n.5, p. 549-558, 2002.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo, Varela, 517p. 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal Food Technology*, v.8, n.1, p. 43-56, 2005.

WALSTRA, P. WOUTERS, J. T. M. GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. New York: **CRC**, p.109-157, 2006.

WONG, D. W. S. CARMIRAND, W. M. PAVLAT, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* . v. 36, n.8, p.807-844, 1996.

ZINSLY, P. F. SGARBIERI, V. C. DIAS, N. F. G. P. JACOBUCCI, H. B. PACHECO, M. T. B. BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, 4:1-8, 2001.