



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA DE  
PEPTÍDEOS DERIVADOS DO CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ  
(*Oryza sativa* L.)

**INAJARA BEATRIZ BROSE PIOTROWICZ**

Engenheira de Alimentos

MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS MELLADO

Orientadora

MARTA MIGUEL CASTRO

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA  
DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DO CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE  
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

INAJARA BEATRIZ BROSE PIOTROWICZ

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do  
título de Doutor em Engenharia e  
Ciência de Alimentos.

MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS MELLADO

Orientadora

MARTA MIGUEL CASTRO

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

### Ficha catalográfica

P658a Piotrowicz, Inajara Beatriz Brose.  
Avaliação das propriedades antioxidante e anti-hipertensiva de peptídeos derivados do concentrado proteico de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) / Inajara Beatriz Brose Piotrowicz. – 2016.  
156 f.

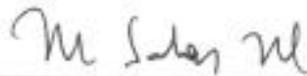
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado.

1. Farelo de arroz 2. Proteínas concentradas 3. Hidrolisados proteicos 4. Peptídeos bioativos I. Salas-Mellado, Myriam de las Mercedes  
II. Título.

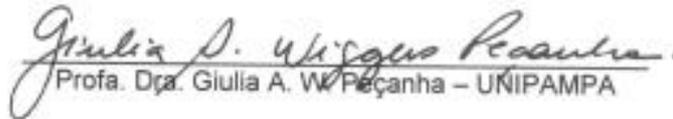
CDU 633.18

## APROVAÇÃO

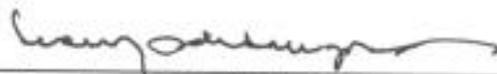
Tese defendida por Inajara Beatriz Brose Piotrowicz e aprovada em 27 de maio de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Myriam de las M. Salas Meliado – FURG



Profa. Dra. Giulia A. W. Peçanha – UNIPAMPA



Profa. Dra. Leonor Almeida de S. Soares – FURG



Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon – FURG



Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández – FURG



Dedico essa Tese à minha Família que sempre me apoiou e acreditou no meu esforço e potencial.



## Agradecimentos

Os meus agradecimentos vão para todos aqueles que, de forma direta ou indireta, confiaram no trabalho e me auxiliaram no desenvolvimento do mesmo.

Agradeço primeiramente à Deus por estar sempre presente, me ajudando a enfrentar os obstáculos e ensinando a aproveitar as oportunidades e as coisas boas que colocou no meu caminho. Ao meu anjo da guarda, muitas vezes “atrapalhado”, mas que sempre esteve comigo, me dando proteção.

Agradeço à minha Família, que sempre confiaram no meu trabalho e me estimularam a lutar pelos meus objetivos, me dando todo o apoio físico, moral e financeiro. À minha Mãe que, de forma indireta, fez toda a faculdade, mestrado e doutorado comigo, participando das minhas alegrias e aflições. Aos meus irmãos que sempre foram minha inspiração para lutar pelo meu futuro. Às minhas cunhadas pela confiança e carinho. Ao João Leal Vivian que abriu muitas portas durante esse período de 4 anos do doutorado.

Aos meus velhos amigos, que mesmo longe, quando perto sempre tiveram interesse e preocupação comigo e meu trabalho.

Aos meu novos e velhos amigos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos que estavam sempre “Ali” para uma boa discussão científica, prontos para as festas de aniversário e de datas especiais ou simplesmente por estarmos “Ali”. Nesse grande grupo um Muito Obrigado especial à Técnica Sabine Aquino, que sempre se demonstrou muito dedicada ao seu trabalho, à ajudar quando possível e pela amizade. Às companheiras Meritaine Rocha, Janise Colembergue, Michele Coelho e Renata Fonseca pelo empenho em me ajudar nos momentos difíceis. Ao colega Claudio Gabiatti Jr. que sempre foi tão solidário e me ajudou muito em momentos difíceis. Aos alunos Matheus Cardoso e Flávia Freire do curso de Engenharia de Alimentos que me auxiliaram na etapa inicial do desenvolvimento desse trabalho como iniciantes científicos voluntários nos anos de 2013 e 2014.

Aos professores Carlos Prentice e Vilásia Martins pelo profissionalismo, auxílios quando solicitado e amizade. À minha Orientadora Myriam de las Mercedes Salas Mellado, que está comigo desde 2005 e sempre me deu todas as oportunidades de crescimento durante este período. Aos demais professores da escola de Química e Alimentos por compor o Curso de Engenharia de Alimentos e o Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, o qual tenho muito orgulho de ter feito parte e certamente foi a ferramenta que me fez tornar o profissional que sou hoje. À Secretária do PPG-ECA Islanda Maria Bolbadilha Passos que sempre esteve envolvida nos trâmites burocráticos e sempre muito dedicada em conseguir atender os nossos pedidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), fundação do Ministério da Educação (MEC), que desempenha papel fundamental na expansão e consolidação da pós-graduação *stricto sensu* (mestrado e doutorado) em todos os estados da Federação, um Muito obrigado pelo apoio financeiro (Bolsa de Demanda Social e Programa Doutorado Sanduíche no Exterior), importantíssimo ao desenvolvimento desse trabalho.

*Agradezco muchísimo a la Dra Marta Miguel Castro que aceptó mi solicitud para trabajar con su “Gran” Grupo BIOPEP en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), un centro misto de titularidad compartida entre el Consejo Superior de*

*Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), que no escatimó esfuerzos para proporcionarme las condiciones para llevar a cabo este trabajo. Personas maravillosas, estando cerca o lejos, pero siempre listos a ayudarme. Agradezco a Marta Garcés Rimón y Silvia Moreno por la amistad y paciencia para enseñarme todo lo que necesité durante los nueve meses que estuve en Madrid.*

*A todas aquellas personas que de un modo u otro han colaborado en la realización de este trabajo. Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre, que proporcionó todo el espacio y estructura para llevar a cabo gran parte del trabajo. Quiero agradecer a Manolo, técnico del departamento, su ayuda y las conversaciones mantenidas durante el café en la cafetería de la Facultad.*

Não poderia deixar de agradecer à Danize Rizzetti, uma grande amiga brasileira que Madri me apresentou. Grande parceira e professora que nunca hesitou em me ajudar nesse trabalho, tanto no desenvolvimento das metodologias como na discussão dos resultados. Pela amizade iniciada em Madri com Lidiane e Gabriela, formando o “Grande Quarteto” de *Brasileñas*, que certamente foi importante para fazer me sentir mais em Casa.

Agradeço aos integrantes da banca, Giulia Alessandra Wiggers Peçanha por aceitar e disponibilizar-se a colaborar com essa Tese. Aos professores e amigos do PPG-ECA Carlos Prentice, Jaqueline Garda Buffon e Leonor Almeida de Souza Soares por também dar as suas contribuições a este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que tiveram alguma influência com o desenvolvimento desse trabalho que tive tanto prazer em realizar, que me propiciou um grande crescimento intelectual e profissional e certamente me trará muita satisfação.

Nunca considere o estudo como uma obrigação e sim como uma oportunidade de penetrar no maravilhoso e belo mundo do saber.

Albert Einstein



## RESUMO

Os peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas que, embora inativos no seu interior, ao ser liberados durante o processo de hidrólise possuem uma influência importante na saúde humana com propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas. O objetivo deste trabalho foi hidrolisar as proteínas concentradas do farelo de arroz desengordurado com rendimentos satisfatórios e produzir peptídeos com propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas. Os farelos foram obtidos integral e desengordurado de indústrias locais. O farelo de arroz integral foi desengordurado em laboratório (FAD-1) e comparado com o desengordurado na indústria (FAD-2). As proteínas do FAD-1 e FAD-2 foram extraídas utilizando o processo pH-shifting e as proteínas concentradas do FAD-1 (CPFAD-1) apresentaram rendimentos maiores que as proteínas concentradas do FAD-2 (CPFAD-2). Essas proteínas apresentaram baixo peso molecular (50 kDa) e alta digestibilidade. Não houve diferença na estrutura das proteínas dos concentrados, demonstrado pelo espectro de infravermelho, e as bandas caracterizadas pela presença de interações de Amida I e II, característicos de proteínas, foram encontrados nos dois espectros. O CPFAD-2 apresentou maior estabilidade térmica que o CPFAD-1, provavelmente em função da desnaturação da proteína ocorrida nos tratamentos industriais realizados no FAD-2. Foram utilizadas enzimas comerciais para hidrolisar CPFAD-1 e CPFAD-2, como a Alcalase (HPFAD-1A e 2A) e a Flavourzyme (HPFAD-1F e 2F). O maior valor de grau de hidrólise foi obtido com a Alcalase, onde o concentrado CPFAD-2 foi mais suscetível ao ataque de ambas as enzimas. Os hidrolisados foram ultrafiltrados em membrana de 3 kDa e as frações peptídicas menores de 3 kDa, denominados HPFAD-1A<3, HPFAD-2A<3, HPFAD-1F<3 e HPFAD-2F<3, respectivamente, foram produzidas. As frações de peptídeos menores de 3 kDa mostram melhores propriedades antioxidantes e inibidoras da enzima conversora da angiotensina (ECA). Os HPFAD com a Flavourzyme foram mais efetivos como antioxidantes e, com a Alcalase, mais efetivos com inibidores da ACE. O estudo *in vivo*, com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos aos tratamentos agudos, comprovou que os peptídeos presentes em HPFAD-1A<3 foram os mais potentes na diminuição da pressão arterial sistólica (PAS). Não foi verificada a ação direta dos peptídeos menores de 3 kDa no relaxamento dos anéis de aorta dos ratos SHR. Ao final do estudo, 8 animais foram tratados com os peptídeos do HPFAD-1A<3 e 7 ratos com água (como controle). Eles foram eutanasiados, extraindo-se o plasma sanguíneo para testes de atividade antioxidante (ORAC), de peroxidação lipídica (MDA) e avaliação da atividade da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA). O fígado foi extraído para analisar a concentração de Glutathione reduzida (GSH). Essas análises mostraram que os ratos tratados com os peptídeos de farelo de arroz apresentaram melhorias nas respostas de atividade antioxidante (GSH), de peroxidação lipídica e de inibição da ECA. Em conclusão, o hidrolisado HPFAF-1A<3 pode ser utilizado como ingrediente funcional e ser incluído em alimentos funcionais para prevenir e/ou tratar a hipertensão arterial e outras patologias relacionadas.

**Palavras-chave:** Farelo de arroz. Proteínas concentradas. Hidrolisados proteicos. Peptídeos bioativos.



## ABSTRACT

### ANTIOXIDANT AND ANTIHYPERTENSIVE PROPERTIES OF PEPTIDES FROM RICE BRAN (*Oryza sativa* L.) PROTEIN CONCENTRATE

Bioactive peptides are protein fragments that although inactives in the the proteins, to be released during the hydrolysis process and play an effective influence in human health with antioxidant and antihypertensive properties. The objective of this study was to hydrolyze protein concentrates from defatted rice bran obtained via pH-shifting process with satisfactory yields. Rice bran was obtained integral and defatted from local industry. Integral rice bran was defatted in laboratory (DRB-1) and compared with industrial defatted (DRB-2). The proteins from DRB-1 and DRB-2 were recovered using pH-shifting process and DRB-1 protein concentrates (DRBPC-1) had higher yields than the protein concentrated from DRB-2 (DRBPC-2). The protein concentrates had lower molecular weights (50 kDa) and high digestibility. There was no difference in the structure of the protein concentrates showed by the FTIR, and the band interactions was characterized by the presence of amide I and II, characteristic of proteins were found in the two spectra. The DRBPC-2 showed higher thermal stability than the DRBPC-1, probably due to denaturation of the protein occurred in industrial processes carried out in the DRB-2. Commercial enzymes to hydrolyze DRBPC-1 and DRBPC-2, like Alcalase (DRBPH-1A and 2A) and Flavourzyme (DRBPH-1F and 2F) were used. The greatest degree of hydrolysis values was obtained with Alcalase, where in the concentrated DRBPC-2 was more susceptible to the attack of both enzymes. The hydrolysates were ultrafiltrated through a 3 kDa membrane, and peptides fractions smaller than 3 kDa called DRBPH-1A<3, DRBPH-2A<3, DRBPH-1F<3 and DRBPH-2F <3, were produced. The peptide fractions smaller than 3 kDa showed better antioxidant properties and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. The DRBPH with Flavourzyme were more effective as antioxidants and with Alcalase, more effective as ACE inhibitors. The *in vivo* study with spontaneously hypertensive rats (SHR) subjected to short-time treatments proved that peptides present in DRBPH-1A<3 were the most effective in lowering systolic blood pressure (SBP). There was no direct action of peptides smaller than 3 kDa in relaxation of the aorta rings of SHR. At the end of the study, 8 rats were treated with peptides DRBPH-1A<3 and 7 rats with water (as control). They are euthanized, extracting the plasma for antioxidant activity assays (ORAC), lipid peroxidation (MDA) and evaluation of the activity of Angiotensin Converting Enzyme (ACE). The liver was extract to analyze the concentration of reduced glutathione (GSH). These analyzes showed that rats treated with rice bran peptides improve the responses to antioxidant activity (GSH), lipid peroxidation and ACE inhibition. In conclusion, the hydrolyzate DRBPH-1A<3 may be used as functional ingredient and be included in functional foods for preventing and/or treating arterial hypertension and other related diseases.

**Keywords:** Rice bran. Protein concentrates. Protein hydrolysates. Bioactive peptides.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estágios da pressão alta em Adultos (INC, 2015).....	54
Tabela 2- Faixa de variação da relação FAD:H <sub>2</sub> O, temperatura e tempo na obtenção do CPFAD. ....	68
Tabela 3- Composição proximal química (b.s.) dos farelos FAD-1 e FAD-2.....	85
Tabela 4- Valores de rendimento, conteúdo proteico e rendimento em proteína dos concentrados proteicos ( $\alpha=1,68$ ). ....	87
Tabela 5- Efeitos da relação farelo:água, (FAD:H <sub>2</sub> O) temperatura (T) e tempo (t) no rendimento em massa (Rc), porcentagem de proteína (Pt) e rendimento em proteína (Rpt) do CPFAD-1 e CPFAD-2. ....	88
Tabela 6- Análise de variância do CPFAD-1 e CPFAD-2 a um nível de confiança de 95%...	89
Tabela 7- Composição proximal (b.s*) dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2 .....	93
Tabela 8- Atividade antioxidante das proteínas concentradas, hidrolisadas e peptídeos menores de 3 kDa determinadas por ORAC. ....	103
Tabela 9- Absorbâncias referentes ao poder redutor das amostras de proteínas concentradas, hidrolisadas e peptídeos menores de 3 kDa provenientes do farelo de arroz. ....	104
Tabela 10- Inibição da ECA apresentada pelas frações peptídicas menores de 3 kDa provenientes do farelo de arroz desengordurado. ....	106
Tabela AP 1- Cinética de hidrólise (tempo vs. volume gasto de NaOH) dos concentrados proteicos de farelo de arroz com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. ....	143
Tabela AP 2- Efeito inibidor dos peptídeos menores de 3 kDa provenientes dos concentrados proteicos de farelo de arroz com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. ....	145
Tabela AP 3- Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas depois da administração oral dos diferentes peptídeos menores de 3 kDa. ....	146
Tabela AP 4- Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a administração oral de diferentes doses dos peptídeos presentes em HPFAD-1A<3. ....	147
Tabela AP 5- Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a administração oral dos diferentes peptídeos menores de 3 kDa. ....	148

Tabela AP 6- Pressão arterial sistólica (PAS) obtidos de ratos Wistar-Kyoto (WKY) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a administração oral dos peptídeos presentes em HPFAD-1A<3. .... 149

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Morfologia do grão de arroz. ....	33
Figura 2- Ilustração da formação da ligação peptídica. ....	35
Figura 3- Estruturas formadoras das proteínas. ....	36
Figura 4- Esquema demonstrativo da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. ....	39
Figura 5- A: Estrutura da N-metilacetamida e B: as atribuições das suas absorções pela espectroscopia de infravermelho. ....	41
Figura 6- Apresentação geral de uma curva de DSC. ....	42
Figura 7- Esquema demonstrativo da reação de hidrólise e síntese de proteínas. ....	44
Figura 8- Estrutura molecular, nome e nomenclaturas dos aminoácidos essenciais. ....	48
Figura 9- Estrutura molecular, nome e nomenclaturas dos aminoácidos não essenciais. ....	49
Figura 10- Oxidação da fluoresceína pelo radical peroxil. ....	53
Figura 11- Ilustração do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). ....	55
Figura 12- Estrutura cristalina da Enzima Conversora da Angiotensina complexada com lisinopril. ....	56
Figura 13- Processo geral da obtenção do concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado (CPFAD). ....	67
Figura 14- Processo de obtenção do hidrolisado de CPFAD. ....	72
Figura 15- Esquema de estudo das propriedades bioativas das proteínas concentradas, hidrolisadas e ultrafiltradas do farelo de arroz. ....	75
Figura 16- Sistema de medição da PAS de ratos SHR. ....	79
Figura 17- Sistema para avaliação da reatividade em anéis de aorta. ....	81
Figura 18- Superfícies de resposta que relacionam [A] os rendimentos em massa de concentrado ( $R_c$ ) e [B] rendimento em proteína ( $R_{pt}$ ) para o CPFAD-2 com os parâmetros FAD:H <sub>2</sub> O e temperatura (T). ....	90
Figura 19- Superfícies de resposta que relacionam a porcentagem de proteína ( $P_t$ ) do CPFAD-2 com [A] relação FAD:H <sub>2</sub> O e temperatura (T) e [B] temperatura (T) e tempo (t). ....	91
Figura 20- Perfil eletroforético das proteínas dos concentrados proteicos de farelo de arroz. ....	94
Figura 21- Espectros de infravermelho dos concentrados (A) CPFAD-1 e (B) CPFAD-2. ....	97

Figura 22- Fotografia dos precipitados formados no ponto isoelétrico das proteínas dos Farelos 1 e 2.....	98
Figura 23- Microscopia eletrônica de varredura dos precipitados da proteína extraída do FAD-1 (a – 100x; A – 2.000x) e FAD-2 (b – 100x; B – 2.000x).....	99
Figura 24- Cinética de hidrólise dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2 com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.....	100
Figura 25- Variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após a administração intragástrica de água, captopril e diferentes peptídeos menores de 3kDa.....	109
Figura 26- Variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos após a administração intragástrica de água, captopril e diferentes doses dos peptídeos presentes em HPFAD-1A<3.....	110
Figura 27- Variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após a administração intragástrica de água, captopril e diferentes peptídeos de massa molecular menor que 3 kDa na concentração de 80 mg/kg.....	112
Figura 28- Pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtido de ratos Wistar-Kyoto (WKY) após a administração intragástrica de água e dos peptídeos de HPFAD-1A<3 (80 mg/kg).....	113
Figura 29- Valores correspondentes ao comportamento dos anéis de aorta controle e em presença da acetilcolina e dos peptídeos menores de 3 kDa.....	115
Figura 30- Atividade antioxidante plasmática em ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3 medido através dos radicais livres de oxigênio (ORAC).....	117
Figura 31- Concentração de malonaldeído (MDA) em plasma dos ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3.....	118
Figura 32- Atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) em plasma de ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3.....	119
Figura 33- Concentração de glutatona reduzida em tecido hepático de ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3.....	120
Figura AP 1- Curva de DSC do CPFAD-1 com os respectivos valores de temperatura de início (Onset), de pico (Peak) e final (End) e a variação de entalpia (Heat) de desnaturação.....	141
Figura AP 2- Curva de DSC do CPFAD-2 com os respectivos valores de temperatura de início (Onset), de pico (Peak) e final (End) e a variação de entalpia (Heat) de desnaturação.....	142
Figura A 1- Ficha técnica de alimento para ratos, ramister e camundongo (A04/A04C/R04).....	150

## ABREVIATURAS

%D: Porcentagem de digestibilidade

AAPH: 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato

AE: atividade enzimática

AGT: Angiotensinogênio

AT1: Angiotensina I

AT2: Angiotensina II

AUC: área abaixo da curva

b.s.: base seca

B: volume de base (NaOH) adicionado na hidrólise

BPM: batimentos por minutos

C<sub>p</sub>: concentração de proteína hidrolisada pela enzima

C<sub>pe</sub>: concentração de proteína na enzima

CPFAD: concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado

CPFAD-1: concentrado proteico de FAD-1

CPFAD-2: concentrado proteico de FAD-2

DSC: (*Differential Scanning Calorimetry*) Calorimetria Diferencial de Varredura

ECA: Enzima Conversora da Angiotensina

f<sub>0</sub>: fluorescência no tempo zero

FAD: farelo de arroz desengordurado

FAD:H<sub>2</sub>O: relação FAD e água

FAD-1: farelo de arroz desengordurado no laboratório

FAD-2: farelo de arroz desengordurado na indústria

F<sub>BM</sub>: fluorescência do branco de amostra

F<sub>c</sub>: fluorescência do controle

f<sub>i</sub>: fluorescência depois de i minutos

F<sub>M</sub>: fluorescência da amostra

FTIR: (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

GH: Grau de Hidrólise

GPx: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa reduzida

h: quantidade de ligações quebradas

HCl: ácido clorídrico

HHL: Hipuril-histidil-leucina

HPFAD-1A: hidrolisado proteico do CPFAD-1 com a enzima Alcalase

HPFAD-1A<3: hidrolisado proteico do CPFAD-1 com a enzima Alcalase menor que 3 kDa

HPFAD-1F: hidrolisado proteico do CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme

HPFAD-1F<3: hidrolisado proteico do CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme menor que 3 kDa

HPFAD-2A: hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Alcalase

HPFAD-2A<3: hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Alcalase menor que 3 kDa

HPFAD-2F: hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme

HPFAD-2F<3: hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme menor que 3 kDa

$h_{total}$ : quantidade total de ligações

IC<sub>50</sub>: capacidade de inibição de 50% da atividade da ECA

IECA: inibição da enzima conversora da angiotensina

KCl: cloreto de potássio

$m_{conc.}$ : massa do concentrado

MDA: malonaldeido

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

$m_{FAD}$ : massa do farelo de arroz desengordurado

$M_p$ : massa de proteína da amostra submetida à hidrólise

NaOH: hidróxido de sódio

NB: Molaridade da base (NaOH)

ORAC: (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio

PAS: pressão arterial sistólica

$P_{conc.}$ : quantidade de proteína do concentrado

$P_{CPFAD}$ : porcentagem de proteína do CPFAD

$P_{\text{digerida}}$ : porcentagem de proteína digerida

$P_{\text{enzima}}$ : porcentagem de proteína da enzima

$P_{\text{FAD}}$ : quantidade de proteína do farelo de arroz desengordurado

$p_k$ : constante de dissociação

$P_{\text{pt}}$ : porcentagem de proteína

RAAS: (*Renin Angiotensin Aldosterone System*) Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

$R_c$ : rendimento em massa de concentrado

$R_{\text{pt}}$ : rendimento em proteína

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

SHR: (*Spontaneously Hypertensive Rats*) Ratos espontaneamente hipertensos

T: temperatura

t: tempo

$T_0$ : temperatura inicial de desnaturação

TBARS: (*Tiobarbituric Acid Reactive Substances*) Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

$T_d$ : temperatura de pico de desnaturação

$T_f$ : temperatura final de desnaturação

$V_a$ : Volume de amostra

$V_e$ : volume de enzima

WKY: ratos Wistar-Kyoto

$\alpha$ : média de dissociação dos grupamentos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>

$\Delta H$ : variação de entalpia

$\Delta \text{PAS}$ : variação da pressão arterial sistólica

$\Delta T$ : variação de temperatura



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
3.1 FARELO DE ARROZ.....	33
3.2 PROTEÍNAS E FONTES PROTEICAS .....	34
3.3 CONCENTRADO PROTEICO .....	36
3.4 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS CONCENTRADAS .....	38
3.5 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	39
3.5.1 Massa molecular das proteínas.....	39
3.5.2 Digestibilidade da proteína .....	40
3.5.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	40
3.5.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	41
3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
3.6 HIDRÓLISE PROTEICA .....	43
3.7 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS .....	45
3.7.1 Alcalase.....	46
3.7.2 Flavourzyme .....	47
3.8 PEPTÍDEOS E AMINOÁCIDOS .....	47
3.9 A PROPRIEDADE BIOATIVA DOS PEPTÍDEOS .....	49
3.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	51
3.10.1 Técnicas de Determinação das Propriedades Antioxidantes.....	52
3.11 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA.....	54
3.11.1 Determinação in vitro da atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (IECA).....	57
3.12 DETERMINAÇÃO IN VIVO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA .....	58
3.12.1 Modelos animais.....	58
3.12.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).....	60

3.13 FUNÇÃO ENDOTELIAL E REATIVIDADE VASCULAR.....	61
3.14 ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO VASCULAR.....	62
3.15 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	63
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
4.1 MATERIAL.....	65
4.2 INFRAESTRUTURA.....	66
4.3 MÉTODOS.....	66
4.3.1 Preparo e composição do farelo desengordurado.....	66
4.3.2 Obtenção dos concentrados proteicos do farelo de arroz desengordurado (CPFAD).....	67
4.3.3 Produção e caracterização dos concentrados proteicos.....	68
4.3.4 Massa molar dos concentrados proteicos.....	69
4.3.5 Digestibilidade dos concentrados proteicos.....	69
4.3.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos concentrados proteicos.....	70
4.3.7 Espectrometria de infravermelho (FT-IR) dos concentrados proteicos.....	70
4.3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos concentrados proteicos.....	70
4.3.9 Atividade das enzimas proteolíticas.....	70
4.3.10 Obtenção dos hidrolisados por hidrólise enzimática dos concentrados proteicos.....	71
4.3.11 Determinação do grau de hidrólise (GH) dos hidrolisados.....	72
4.3.12 Fracionamento dos peptídeos.....	73
4.3.13 Estudo das propriedades bioativas das proteínas e dos peptídeos.....	74
4.3.13.1 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC).....	74
4.3.13.2 Poder Redutor.....	76
4.3.13.3 Atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (IECA).....	76
4.3.14 Estudo do efeito de peptídeos de farelo de arroz na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos.....	77
4.3.14.1 Animais experimentais.....	77
4.3.14.2 Efeito agudo dos peptídeos menores de 3 kDa em ratos SHR.....	78
4.3.14.3 Procedimento de pletismografia em cauda.....	78
4.3.15 Método de avaliação da reatividade vascular na artéria aorta.....	80
4.3.15.1 Período de estabilização e contração do anel de aorta com cloreto de potássio (KCl).....	80

4.3.15.2 Teste de integridade funcional do endotélio e provas com os peptídeos menores de 3 kDa.....	81
4.3.16 Testes bioquímicos em plasma sanguíneo e fígado de ratos SHR.....	81
4.3.16.1 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) em plasma sanguíneo.....	82
4.3.16.2 Níveis de malonaldeído (MDA) no plasma sanguíneo.....	82
4.3.16.3 Atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) no plasma sanguíneo.....	83
4.3.16.4 Níveis de glutathiona no fígado.....	83
4.3.17 Análise estatística.....	84
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS FARELOS DESENGORDURADOS.....	85
5.2 RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTEICOS .....	86
5.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS CONCENTRADOS PROTEICOS .....	92
5.4 MASSA MOLAR E DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DOS CONCENTRADOS PROTEICOS .....	93
5.5 DIGESTIBILIDADE DOS CONCENTRADOS PROTEICOS .....	94
5.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	95
5.7 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (FTIR) DOS CONCENTRADOS PROTEICOS.....	96
5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DOS CONCENTRADOS PROTEICOS .....	96
5.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E HIDRÓLISE DA PROTEÍNA CONCENTRADA DO FARELO DE ARROZ .....	99
5.10 PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS PROTEÍNAS, HIDROLISADOS E PEPTÍDEOS DE FARELO DE ARROZ.....	101
5.10.1 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	102
5.10.2 Poder Redutor .....	104
5.10.3 Capacidade de inibição da ECA.....	105
5.11 ESTUDO <i>IN VIVO</i> DA PROPRIEDADE ANTI-HIPERTENSIVA DOS PEPTÍDEOS DE FARELO DE ARROZ.....	108
5.11.1 Estudo preliminar.....	108
5.11.2 Efeito de diferentes concentrações de HPFAD-1A<3 na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos.....	110

5.11.3 Efeito de diferentes peptídeos de farelo de arroz na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos.....	112
5.11.4 Efeito dos peptídeos de HPFAD-1A<3 na pressão arterial de ratos normotensos (Wistar-Kyoto).....	113
5.12 REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA DE RATOS SHR .....	114
5.13 TESTES BIOQUÍMICOS EM PLASMA E FÍGADO DE RATOS SHR .....	117
5.13.1 Atividade antioxidante das frações peptídicas de farelo de arroz em plasma de ratos SHR.....	117
5.13.2 Efeito das frações peptídicas de farelo de arroz na atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) em plasma de ratos SHR.....	119
5.13.3 Efeito das frações peptídicas de farelo de arroz níveis de glutathiona reduzida em fígados de ratos SHR.....	120
5.14 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
<b>6 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>124</b>
<b>7 TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>126</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>150</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Hoje em dia se sabe que, além das propriedades nutricionais, os componentes dos alimentos podem exercer distintas atividades biológicas e podem produzir um efeito benéfico sobre uma ou várias funções específicas no organismo. Atualmente existem muitos trabalhos científicos que têm avaliado algum desses componentes como ingredientes de interesse para a saúde, o qual tem sido utilizado para desenvolver novos alimentos, denominados alimentos funcionais. De todos os componentes alimentares, as proteínas têm-se tornado fontes principais para a obtenção de alimentos funcionais. Além do valor nutricional, as proteínas podem exercer diretamente atividades biológicas quando ingeridas na dieta. As investigações em torno das proteínas alimentares se concentram na obtenção de peptídeos bioativos (KORHONEN e PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2002). Os peptídeos pequenos (3 a 20 aminoácidos) podem ser liberados através de processos industriais ou digestão gastrointestinal de alimentos, exercendo um importante papel na regulação e modulação metabólica (SHAHIDI e XHONG, 2008).

Com a progressão da idade, há acúmulo de proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA oxidados em relação a organismos jovens, de acordo com a teoria dos radicais livres, compostos produzidos naturalmente durante os processos metabólicos e, o seu acúmulo, pode acarretar doenças como câncer, diabetes e problemas cardiovasculares. Desde o seu descobrimento em 1979, tem-se descrito a sequência de diversos peptídeos de origem animal e vegetal com diferentes atividades biológicas, como a antioxidante, inibidora da enzima conversora da angiotensina (IECA), hipocolesterolêmica, antimicrobiana, opióide, etc. (CHANPUT; THEERAKULKAIT; NAKAI, 2009; SILVA; FERRARI, 2011).

Entre as atividades biológicas mais estudadas nos peptídeos de origem alimentar se destacam a atividade antioxidante e anti-hipertensiva. O estudo da propriedade anti-hipertensiva de peptídeos normalmente está relacionada com a sua capacidade de inibir a ação da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) (ROY; BOYE; SIMPSON, 2010), porém existem outros mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial, pois a regulação da pressão depende da ação integrada dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino (SANJULIANI, 2002). A ECA é capaz de converter a angiotensina-I em angiotensina-II, que é um potente vasoconstritor e, além disso, promove a inativação da bradicinina, que é considerado um hormônio vasodilatador. Esses processos desencadeiam o aumento de pressão que, para ser minimizada, se faz uso de medicamentos contendo peptídeos inibidores dessa enzima para o tratamento de hipertensão e regulação da pressão arterial (HONG et al., 2008;

ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008). Segundo Miguel et al. (2007 a) os resultados de ensaios realizados *in vivo* apresentam diferenças relacionados com os estudos *in vitro*, devido ao fato que existem transformações fisiológicas que podem determinar a biodisponibilidade dos peptídeos, além de existir outros mecanismos de ação que podem influenciar na pressão arterial, que não o da inibição da ECA, como foi citado anteriormente. Estudos em animais e em humanos demonstram que o aumento da pressão arterial pode estar associado ao estresse oxidativo no sistema vascular que, por sua vez, deve ser a causa e o efeito da hipertensão (PUDDU et al., 2008).

A proteína utilizada para a hidrólise e obtenção dos peptídeos pode ser proveniente de diferentes fontes, onde é importante ser considerado o aproveitamento de subprodutos para o processo. O farelo, obtido através do beneficiamento do arroz, representa cerca de 8 a 11% do grão e possui componentes como carboidratos, proteínas, fibras, lipídeos, sais minerais e vitaminas (KHUWIJITJARU; NUALCHAN; ADACHI, 2007; PARRADO et al., 2006), podendo ser considerado uma fonte de origem vegetal para a produção de concentrados proteicos. Muitas pesquisas têm sido realizadas com o isolamento proteico de cereais, leguminosas, sementes e seus subprodutos (BANDYOPADHYAY; MISRA; GHOSH, 2008; GIRÓN-CALLE; ALAIZ; VIOQUE, 2010; ZHANG et al., 2012; FONTANARI, 2006), com a finalidade de avaliar as propriedades funcionais, físico-químicas e térmicas.

No estado do Rio Grande do Sul, em novembro de 2015, foram beneficiadas mais de 650 mil toneladas de arroz (IRGA, 2015), produzindo-se aproximadamente 71,5 mil toneladas de farelo integral, considerado um coproduto rico em lipídeos que, após ser extraído, obtém-se o farelo desengordurado que possui como segundo maior componente a proteína. A concentração dessas proteínas possibilita que componentes indesejáveis como fibras, cinzas e carboidratos sejam removidos. Essas proteínas podem apresentar diferentes propriedades que serão dependentes da fonte da qual será extraída, do tipo de processo aplicado na indústria e das condições de produção desses concentrados. Além disso, a modificação enzimática produzirá peptídeos de diferentes tamanhos e composição de aminoácidos, aprimorando as características funcionais, nutricionais e bioativas. Zhang et al. (2012) indicaram que a hidrólise enzimática foi efetiva para melhorar as propriedades funcionais e aumentar o campo de aplicação das proteínas concentradas do farelo de arroz desengordurado.

Tem-se realizado estudos para investigar a atividade antioxidante e anti-hipertensiva de peptídeos derivados de proteínas de origem vegetal como a soja, arroz, farelo de arroz, feijão (BOONLA et al., 2015; KANNAN; HETTIARACHCHY; MAHEDEVAN, 2012; KARAS et al., 2014; PUCHALSKA; MARINA; GARCÍA, 2014; UDENIGWE; ALUKO,

2012; ZHANG et al., 2010). Cian; Vioque; Drago (2015) verificaram as propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas de hidrolisados de glúten de trigo, obtendo atividades relevantes em peptídeo com massa molar de 5,5 kDa. Yang et al., (2011) obtiveram peptídeos de germe de trigo, nos quais foram identificados quatro peptídeos e um aminoácido. Zhang et al (2014) produziram peptídeos de farelo de arroz com propriedades antioxidantes, sugerindo que o aumento da atividade estaria associado com a redução da massa molecular, composição de aminoácidos e hidrofobicidade. Assim, o estudo das condições de obtenção de proteínas provenientes do farelo de arroz, objetivando um maior rendimento, seguida da sua modificação enzimática, torna-se importante em função das diferentes propriedades que as mesmas podem apresentar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter concentrados proteicos, provenientes do farelo de arroz desengordurado para produzir peptídeos com propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

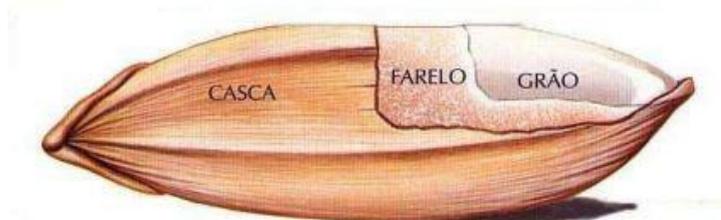
- Determinar a melhor condição de obtenção dos concentrados proteicos de farelo de arroz e caracterizá-los física e quimicamente;
- Hidrolisar enzimaticamente as proteínas concentradas dos farelos e separar as frações menores que 3 kDa, de cada hidrolisado;
- Avaliar a atividade antioxidante e anti-hipertensiva *in vitro* dos concentrados, hidrolisados e dos peptídeos menores de 3 kDa;
- Avaliar o potencial dos peptídeos menores de 3 kDa na redução da pressão arterial sistólica de ratos espontaneamente hipertensos;
- Verificar o efeito antioxidante e anti-hipertensivo de peptídeos menores de 3 kDa no plasma e fígado dos ratos espontaneamente hipertensos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FARELO DE ARROZ

O grão de arroz é formado basicamente pela casca, farelo, germe e endosperma (Figura 1). O farelo, um dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, representa de 8 a 11% do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento (PARRADO et al., 2006). O farelo de arroz apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato. O pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o gérmen são eliminados durante a operação de polimento na forma de farelo de arroz, obtendo o endosperma (LAKKAKULA; LIMA; WALKER, 2004).

**Figura 1-** Morfologia do grão de arroz.



Fonte: [http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/gr\\_divisao.htm](http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/gr_divisao.htm)

As características físicas e químicas do farelo de arroz dependem de fatores como o tipo de cultivar, tratamento do grão antes do beneficiamento, sistema de beneficiamento empregado e grau de polimento ao qual o grão foi submetido. Dessa forma, os valores para a composição do farelo de arroz mostram grande variação o que influencia na composição do produto final. Assim, tornou-se prática comum de mercado especificar os limites máximos e mínimos de tolerância para os componentes majoritários. Embora a legislação brasileira não estabeleça padrões de qualidade para farelo de arroz, a indústria de transformação do arroz (*Oryza sativa*) recomenda como parâmetros os valores citados por Saunders (1990), tendo no mínimo 16% de lipídeos, mínimo de 13% de proteína, máximo de 9% de fibra bruta, no máximo 10% de cinzas e umidade máxima de 12%.

O farelo de arroz constitui excelente fonte de minerais, proteínas e óleo, destacando-se pelo expressivo teor de vitaminas (PARRADO et al., 2006). O elevado conteúdo de lipídeos do farelo de arroz, aliado ao seu baixo valor comercial, justificam seu emprego como matéria-prima para indústria de extração de óleo comestível (DA SILVA; SANCHES; AMANTE,

2006). O farelo integral, ao chegar na indústria, sofre tratamentos para a inativação das lipases que, ao longo do tempo, provocariam a sua rancificação. A peletização é considerada uma tecnologia aplicada na conservação do farelo, no qual ocorre uma aglomeração de partículas moídas, por meio de processos mecânicos, combinadas com a umidade e condições de pressão e calor. Este tratamento utiliza valores de temperatura e de pressão amenos e um maior tempo de processo, em relação à extrusão (MARAGNO; KUHN, 2013). O farelo desengordurado, obtido após extração com hexano, origina um subproduto desengordurado com um conteúdo de aproximadamente 15% de proteína (HAMADA, 2000), e normalmente é direcionado para ração animal (FIREMAN; LÓPEZ; FIREMAN, 1999). Segundo Wang et al., (1999) os aminoácidos presentes no farelo são de grande importância nutricional, o que justificaria o seu uso para a extração de proteínas.

### 3.2 PROTEÍNAS E FONTES PROTEICAS

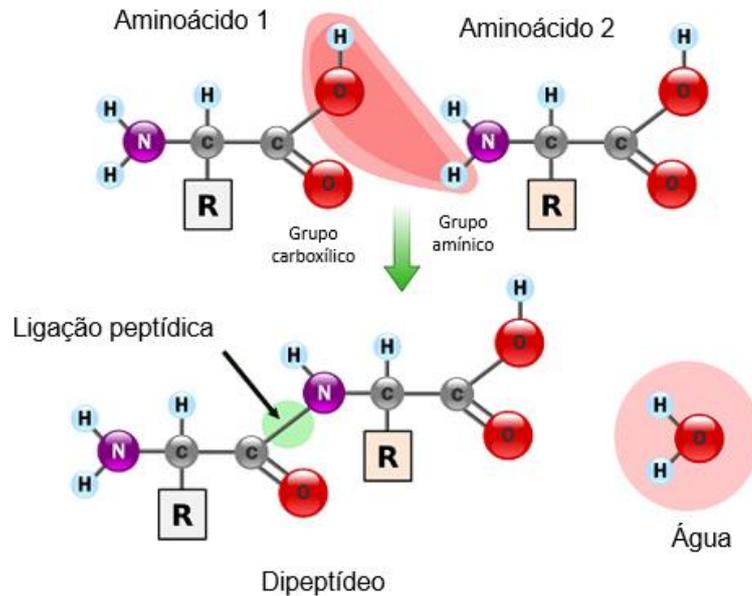
As proteínas são moléculas complexas formadas por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e, às vezes, outros elementos como enxofre, ferro, cobre, fósforo e zinco (ORDÓÑEZ, 2005). São polímeros de L-aminoácidos unidos por ligações peptídicas, que contem grupos funcionais amínicos e carboxílicos, considerados indispensáveis para o funcionamento de todas as células que formam o nosso corpo (GOLDHMAN, 2009) (Figura 2).

Um peptídeo consiste de dois ou mais aminoácidos, onde a junção de mais de dez unidades de aminoácidos, pela ligação peptídica, forma um polipeptídeo. A sequência linear dos resíduos de aminoácidos de um polipeptídeo constitui a sua estrutura primária (MURRAY; FITZGERALD, 2007).

As proteínas são representadas por estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias (Figura 3), porém, do ponto de vista nutricional, apenas a sequência primária é de grande interesse (WATFORD; WU, 2011). A estrutura primária é caracterizada pela sequência de aminoácidos ligados covalentemente entre si por meio de ligações de amida, ou ligação peptídica; a estrutura secundária se forma quando há uma ordenação espacial da cadeia polipeptídica, definida pela composição da própria estrutura primária, que através das interações de pontes de hidrogênio pode ser do tipo helicoidal ou folha estendida; a estrutura terciária se forma quando na secundária há interações do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas, força de van der Waals e pontes de hidrogênio, havendo um desdobramento ainda mais compacto e tridimensional; e, por fim, a estrutura quaternária é definida como um arranjo

especial de mais de uma cadeia polipeptídica (DEMODORAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

**Figura 2-** Ilustração da formação da ligação peptídica.

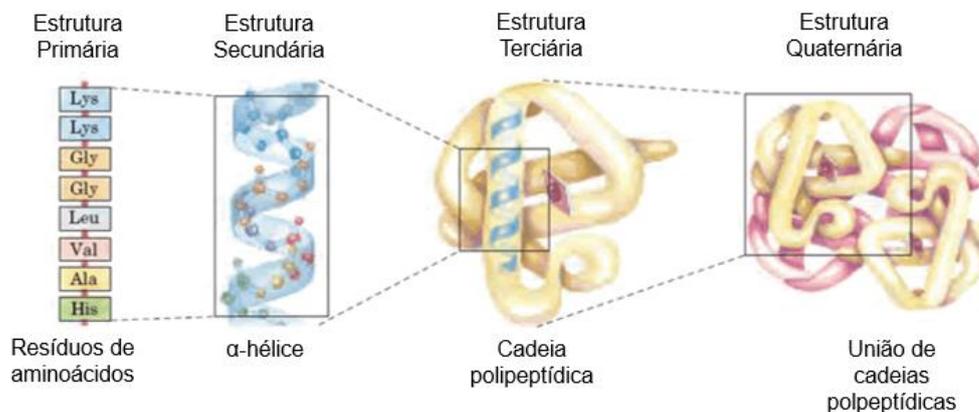


Fonte: <http://mundodabioquimica.blogspot.com.br/2015/01/ligacao-peptidica.html>

As proteínas podem ser provenientes de fontes animais (ovos, leite, gelatina, carnes, pescado) como de fontes vegetais (soja, trigo, arroz, sementes, algas). Devido à disponibilidade, custos e fatores de riscos e doenças relacionadas às proteínas de fontes animais, nutricionistas consideram como alternativa o uso de proteínas vegetais. No entanto, apesar das proteínas provenientes de plantas serem normalmente mais baratas, elas são consideradas pobres em determinados aminoácidos essenciais, energia e minerais, como o fósforo, quando comparado com proteínas de fontes animais (KUMAR et al., 2014; YUN et al., 2005). Dentre as proteínas estudadas por Yun et al. (2005), a relação de aminoácidos essenciais do concentrado proteico de arroz foi maior comparada com as demais fontes estudadas (farinha de soja, proteína concentrada de soro de leite e farinha de pescado), com exceção da lisina que foi mais representativa na farinha de pescado. A proteína do farelo de arroz tem sido utilizada como substituinte hipoalergênico do leite em formulações infantis, e em função do seu perfil de aminoácidos a torna ingrediente apropriado para formulações desse tipo de alimento (WANG et al., 1999). Além disso, pesquisas são desenvolvidas na produção de isolados e concentrados proteicos, sendo que a qualidade da proteína do farelo só

é inferior à da aveia, superando a do trigo e a do milho (BANDYOPADHYAY; CHAKRABORTY; BARMAN, 2012).

**Figura 3-** Estruturas formadoras das proteínas.



Fonte: Lehinger, 2004

Segundo Fabian e Ju (2011) as proteínas do farelo de arroz apresentam 37% das proteínas solúveis em água, 31% solúveis em solução salina, 27% em soluções alcalinas e 2% solúveis em soluções alcoólicas.

### 3.3 CONCENTRADO PROTEICO

Durante muito tempo se tem estudado e produzido isolados e concentrados proteicos de fontes de origem animal e vegetal. O isolamento pode ser feito por via enzimática (XIA et al., 2012) ou química (ZHANG et al., 2012). Na enzimática, se faz uso de carboidrases (amilases) para melhorar o processo de extração proteica (TANG et al., 2003). Com relação à química, o processo consiste na solubilização proteica em pH ácido ou alcalino, seguida da precipitação no ponto isoelétrico da proteína (NOLSØE; UNDELAND, 2009).

Segundo Nolsøe e Undeland (2009) o processo de solubilização ácida ou alcalina foi desenvolvido na Universidade de Massachusetts (Massachusetts Marine Station, Gloucester, MA, USA). Este processo utiliza o princípio de que um material homogeneizado em água é afetado pelo pH. Em condições de pH extremos, ácidos ou alcalinos, mudanças ocorrem nas cargas das proteínas promovendo a repulsão entre elas e conseqüentemente a sua interação com a água, ou seja, a sua solubilização. Esse princípio se iniciou com músculos de peixe, porém hoje se utilizam diferentes fontes proteicas, como sementes, cereais, leguminosas,

oleaginosas. Estudos com amêndoas (LACERDA et al., 2010), semente de amaranto (FRITZ et al., 2011), abóbora (NKOSI; OPOKU; TERBLANCHE, 2005), soja (PEÑA-RAMOS; XIONG, 2002), arroz (AGBOOLA; NG; MILLS, 2005), farelo de arroz (BOONLA et al., 2015; ZHANG et al., 2012; CHANDI; SOGI, 2007) são exemplos de fontes de origem vegetal para a extração de proteínas.

Segundo Bandyopadhyay; Chakraborty; Barman (2012) o farelo de arroz necessita de um processo de extração cuidadosamente selecionado para se obterem concentrados e isolados com propriedades satisfatórias. Devido às fortes ligações dissulfídicas e agregações uma grande porção de proteínas do farelo não podem ser extraídas em meio aquoso. A alteração do pH do meio pode facilitar a extração causando a solubilização das proteínas, porém o tratamento extremamente alcalino pode causar a desnaturação proteica, escurecimento da amostra e extração de compostos não proteicos (WANG et al., 1999). Segundo Frota (2007) a extração das proteínas tem sido maior em pH entre 8,5 e 12,5, porém quanto menor o pH de alcalinidade, maior será a pureza do isolado. Jiamyangyuen et al.(2005), estudaram a eficiência da extração das proteínas do farelo de arroz em diferentes valores de pH e tempo de extração, concluindo que a melhor condição para obter as proteínas do farelo foi de pH 11,0 e no tempo de 45 minutos, resultando em um concentrado com 69,16% de proteína e um rendimento de 8,06%.

Chandi; Sogi (2007) produziram isolados proteicos a partir de farelo de arroz desengordurado e estabilizado e estudaram suas propriedades funcionais, verificando que o isolado apresentou melhor capacidade de retenção de água e óleo que a caseína, uma proteína padrão. O isolado apresentou baixa capacidade de formar espuma, porém um bom potencial de estabilidade de emulsão. Assim, consideraram que seus produtos poderiam ser aplicados em alimentos de desmame, misturas secas, alimentos assados, coberturas batidas, molhos de salada, etc. Proteínas extraídas do farelo de arroz desengordurado e estabilizado através do aquecimento podem ser utilizadas como ingredientes nutracêuticos para a sua inclusão em alimentos funcionais (TANG et al., 2003). O desenvolvimento de novos itens alimentares com subprodutos de arroz exige informações mais precisas sobre componentes desejáveis e indesejáveis.

Assim, os estudos realizados por Chandi; Sogi (2007), Zhang et al. (2012) e Silva (2012) demonstram as propriedades funcionais de concentrados e isolados proteicos de farelo de arroz, porém existem outras características que podem ser estudadas. Chandi; Sogi (2007) verificaram que os concentrados de farelo de arroz apresentaram melhores capacidades de absorção de água e óleo quando comparado com a caseína. Além disso, possuíam baixo

volume de espuma, mas as propriedades emulsificantes foram satisfatórias. Zhao et al. (2012), ao estudarem as proteínas extraídas do endosperma de arroz, avaliaram além das propriedades funcionais, propriedades térmicas e estruturais obtendo algumas diferenças nas suas características com relação às amostras de endosperma nativo e processado, considerando que a desnaturação das proteínas do endosperma processado poderia ser um fator responsável pelas diferenças encontradas nos concentrados, como maiores valores de solubilidade, de propriedade emulsificante, de capacidade de retenção de água e óleo e de estabilidade térmica.

### 3.4 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS CONCENTRADAS

As proteínas são utilizadas como nutrientes de suma importância e o seu valor nutricional irá depender da sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais, e a ausência de toxicidade e ou propriedades anti-nutricionais (SGARBIERI, 1996). O uso das proteínas como ingredientes em alimentos pode dar-se por fatores variados. Além da sua contribuição nutricional, pode também ser a responsável por diferentes texturas e sabores na elaboração de produtos, sendo que pode apresentar diferentes características responsáveis pelo seu direcionamento e função em cada alimento. Essas características são conhecidas como propriedades funcionais, ou seja, solubilidade, capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo, propriedades emulsificantes, propriedades espumantes, capacidade geleificante (DAMODARAM e KINSELLA, 1982). Normalmente as propriedades funcionais das proteínas concentradas são melhores que as apresentadas pelas suas respectivas fontes, como foi confirmado no estudo realizado por Zhao et al.(2012), quando afirmaram que a solubilidade das proteínas concentradas do endosperma do arroz foi maior que do endosperma nativo.

Além das propriedades funcionais, que são de grande importância na elaboração de um produto alimentício, existem outras características que, ao serem definidas, podem auxiliar para determinar alguns parâmetros de processamento e/ou conhecer melhor o seu produto. A funcionalidade das proteínas pode ser determinada pelas suas propriedades físico-químicas e conformacionais (MOHAMED et al., 2009). Alterações nas propriedades funcionais, térmicas e conformacionais das proteínas do endosperma de arroz nativo e tratado termicamente foram encontradas por Zhao et al. (2012), demonstrando a importância do conhecimento das características do produto para possível direcionamento e aplicação em alimentos, além de indicar os processos a que podem ser submetidos.

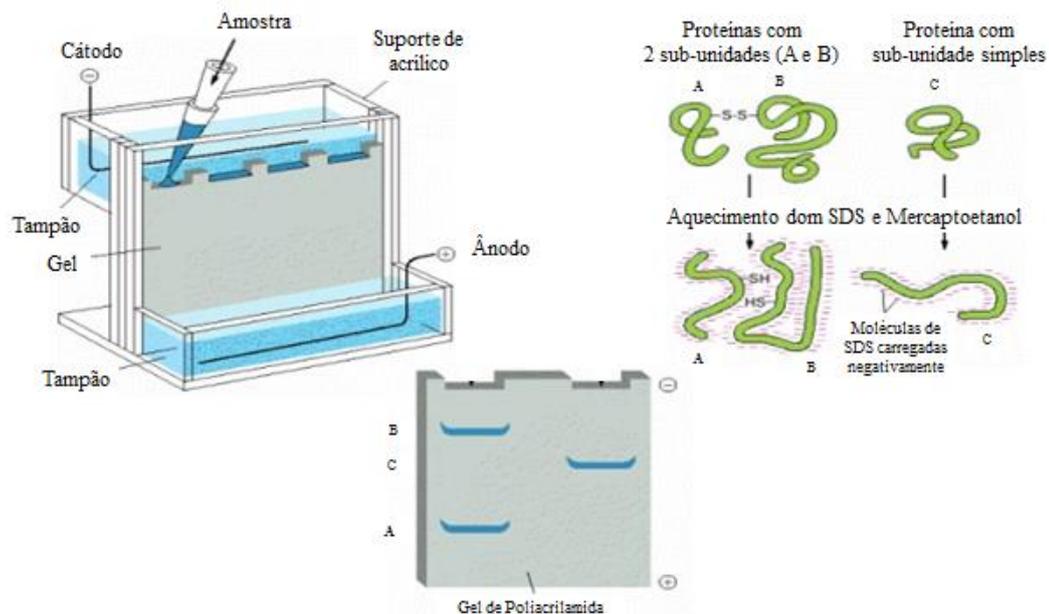
### 3.5 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS

Existem diversas técnicas para avaliar as características das proteínas, como massa molecular, digestibilidade, espectroscopia de infravermelho, calorimetria diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura, dentre outras.

#### 3.5.1 Massa molecular das proteínas

Uma técnica simples para a determinação da massa molecular de proteínas é a eletroforese, que utiliza forças eletroforéticas e eletroosmóticas presentes no sistema (Figura 4).

**Figura 4-** Esquema demonstrativo da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.



SDS: dodecil sulfato de sódio

Como foi citado anteriormente, todas as moléculas de proteínas são formadas por uma cadeia de aminoácidos, unidos entre si por ligações peptídicas (SPELLMAN et al., 2003). Os aminoácidos, por sua vez, possuem uma estrutura em comum, contendo um grupo amino e um grupo carboxil e o chamado grupamento lateral. Este último é a estrutura que fornece a identidade ao aminoácido. A combinação de diferentes aminoácidos, bem como a quantidade de aminoácidos presentes em uma molécula de proteína, confere a ela peso e carga elétrica distinta. As frações separadas são visibilizadas a partir de corante sensível às proteínas e os

resultados podem ser sempre expressos sob forma percentual e de concentração das diversas frações e em forma gráfica (OGNIBENE et al., 2012; SILVA; LOPES; FARIA, 2008).

### 3.5.2 Digestibilidade da proteína

A digestão abrange uma série de processos mecânicos e enzimáticos por meio dos quais os alimentos são decompostos em tamanhos reduzidos e finalmente tornados solúveis a fim de possibilitar a sua absorção (MAYNARD et al., 1969). O modo de avaliação da digestibilidade proteica, durante muito tempo, era realizado apenas *in vivo*, sendo necessário um período longo de experimento e de altas quantidades de amostra (MALIWAL, 1983). Dessa forma, diversos fatores podem afetar a digestibilidade dos alimentos, como a composição química, a interação entre os diferentes ingredientes de uma ração, as formas de preparação dos alimentos (moagem, aquecimento, etc.) e a quantidade de alimento ingerido, além dos fatores inerentes aos animais, como particularidades da fisiologia digestiva (MEDEIROS, 2005). No entanto, a técnica *in vitro* é bem aceita, visto que são utilizadas as mesmas enzimas digestivas, menor quantidade de amostra e o tempo de experimento é menor (MALIWAL, 1983).

### 3.5.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

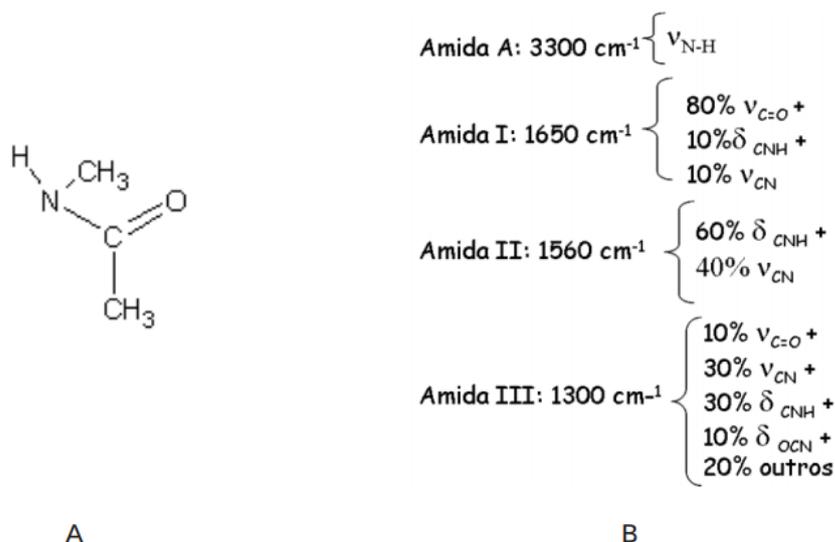
As características dos concentrados proteicos são dependentes do tipo de fonte e das condições em que são produzidos. As proteínas podem ser avaliadas e caracterizadas através da sua estrutura, pelo uso da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As bandas Amida I e Amida II são as duas principais bandas dos espectros infravermelhos de proteínas (Figura 5).

Amida I é a banda mais intensa das proteínas ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) e está associada com a vibração de tensão da ligação C=O. A banda Amida II está relacionada com a vibração de flexão da ligação N-H e com a vibração de tensão das ligações C-N e C-C, sendo sensível a conformação da cadeia. FTIR pode ser utilizada também para determinar a estrutura das proteínas através da sua configuração, como  $\alpha$ -helice, folhas dobrada  $\beta$  ( $\beta$ -sheet) e espiral ( $\beta$ -turns) (ELLEPOLA; CHOI; MA, 2005).

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de ondas entre  $14290$  e  $200\text{ cm}^{-1}$ . A região do que apresenta o número de ondas entre  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  é a mais comumente utilizada pelos

químicos orgânicos, chamada de infravermelho médio. A região do infravermelho próximo, de 14290 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , tem sido aplicado para análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (gasolina e poluentes atmosféricos) (BARBOSA, 2007).

**Figura 5-** A: Estrutura da N-metilacetamida e B: as atribuições das suas absorções pela espectroscopia de infravermelho.



Onde  $\nu$  indica estiramento (ou deformação axial) e  $\delta$  deformação angular.

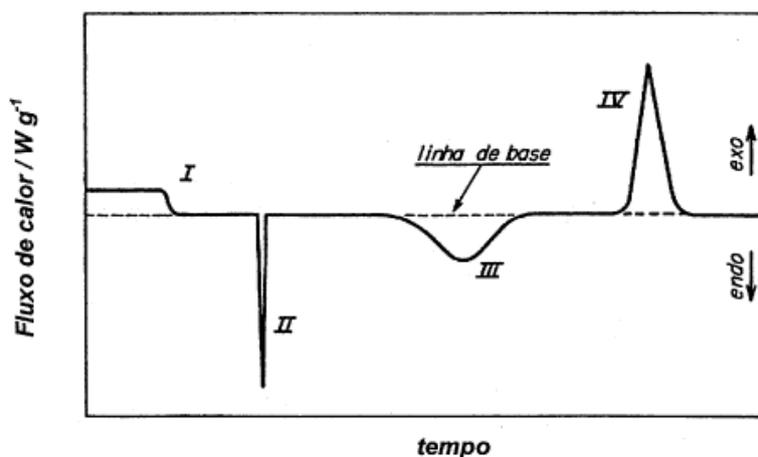
Fonte: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884592/1/DOC512010.pdf>

### 3.5.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada (MATOS e MACHADO, 2004). DSC (Differential Scanning Calorimetry) de fluxo de calor é uma técnica que mede a diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Neste tipo de DSC a amostra de referência é colocada em cápsulas idênticas e aquecidas por uma única fonte de calor. O calor é transferido para as cápsulas de amostra de referência por meio do disco, com o fluxo de calor diferencial entre ambas as cápsulas sendo controlado por meio de termopares conectados ao disco, uma vez que a variação da temperatura ( $\Delta T$ ), em um dado momento é proporcional à variação de entalpia ( $\Delta H$ ), à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo

calórico (MACHADO e MATOS, 2004). Em geral a diferença de temperatura ( $T_{\text{amostra}}$  e  $T_{\text{referência}}$ ) serve de base de cálculo do calor absorvido ou liberado da amostra e o resultado será negativo para os eventos endotérmicos e positivos para os exotérmicos. Nas curvas a representação é feita pelo fluxo de calor, uma seta que acompanha o termo “exo” e “endo”, como demonstrada na Figura 6 (MACHADO e MATOS, 2004).

**Figura 6-** Apresentação geral de uma curva de DSC.



I: Mudança de linha de base sem pico; II e III: Picos endotérmicos; IV: Pico exotérmico.  
Fonte: Bernal et al., 2002.

A temperatura de pico (desnaturação) e variação de entalpia ( $\Delta H$ ) podem estar relacionados com a estrutura e o modo como estão agrupadas as proteínas, pois como foi estudado por Zhao et al (2012), quando trabalharam com proteínas concentradas de endosperma de arroz (REP) e o coproduto do processamento do endosperma, chamada de borra de arroz (RDB), foi verificado que, em comparação com as proteínas nativas do endosperma (REP), a variação da entalpia ( $\Delta H$ ) da RDP foi superior. Os autores sugeriram que a extensão das estruturas ordenadas do RDP foi maior que as das REP, pois as proteínas da borra foram tratadas a uma temperatura de 95-100 °C, por um determinado período de tempo de processamento, considerando que suas proteínas estavam totalmente desnaturadas. Além disso, a possibilidade da formação de agregados entre o amido e proteína ou a glicosilação de subunidades de proteína, poderia aumentar o valor de  $\Delta H$  e a estabilidade.

Zhao et al (2012) estudaram as propriedades térmicas de proteínas concentradas de borra de arroz (RDB), co-produto do processamento industrial o qual foi aplicada altas temperaturas e pressão, verificando que, em comparação com as proteínas nativas do endosperma (REP), a variação da entalpia ( $\Delta H$ ) foi bem maior, sugerindo que a extensão das estruturas ordenadas do RDP foi maior que as das REP, pois as proteínas da borra foram

tratadas a uma temperatura de 95-100 °C, por um determinado período de tempo relacionado com o processamento, considerando que suas proteínas estavam totalmente desnaturadas. Além disso, a possibilidade da formação de complexos entre o amido e proteína ou a glicosilação da proteína poderia aumentar o valor de  $\Delta H$  e a estabilidade.

### 3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia de materiais também tem sido estudada com o intuito de conhecer melhor a sua superfície que, por algum motivo, pode apresentar diferenças não muito visíveis. A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. Os microscópios ópticos convencionais ficam, então, limitados a um aumento máximo de 2000 vezes, porque acima deste valor, detalhes menores são imperceptíveis. Para aumentar a resolução pode-se utilizar uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível como fonte de iluminação do objeto. Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID, GOMES E MACHADO, 2007).

A promoção de diferentes processos pode acarretar na formação de compostos com diferentes morfologias e, conseqüentemente, influenciar em suas características. Joshi et al., (2011) estudaram diferentes técnicas de secagem de proteína concentrada de lentilha, verificando variação na superfície do produto seco por aspensão, liofilização e por vácuo, havendo diferença nas propriedades físico-químicas e conseqüentemente nas propriedades funcionais.

## 3.6 HIDRÓLISE PROTEICA

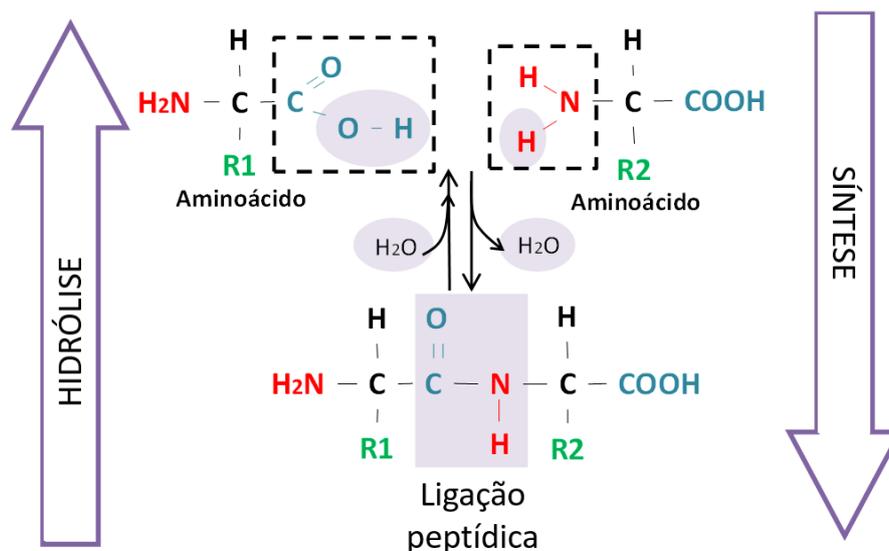
De modo geral, a hidrólise é um termo aplicado a reações orgânicas e inorgânicas em que água ( $H^+$  e  $OH^-$ ) efetua uma dupla troca com outro composto, estabilizando-o (Figura 7). Os hidrolisados proteicos, promissor quando se desejam produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo (MARTINS, 2009), podem ser definidos como proteínas que tem a ligação peptídica clivada, através da atuação de uma enzima, formando peptídeos de tamanhos variados e algumas vezes aminoácidos (ADLER-NISSEN 1986).

Normalmente os hidrolisados enzimáticos são utilizados para melhorar as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos, para o uso em formulação de produtos

farmacêuticos e de aplicação clínica específica, reduzindo a alergenicidade da proteína, além de obter peptídeos bioativos (MOURE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2006).

Na hidrólise enzimática devem ser levado em conta alguns parâmetros, como o tipo de substrato e enzima, a concentração de ambos, o tempo de hidrólise, a temperatura e o pH de reação (DOS SANTOS et al., 2011).

**Figura 7-** Esquema demonstrativo da reação de hidrólise e síntese de proteínas.



Fonte: Miguel (2004).

Segundo Nielsen; Petersen; Dambmann (2001) o parâmetro para monitorar a reação é o grau de hidrólise (GH), definido basicamente como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas. Os hidrolisados podem ser classificados em GH parciais (GH<10%) e extensivos (GH>10%), cada um com suas características específicas e que podem afetar a sua utilização (TORRUCO-UCO et al. 2008).

Há diferentes maneiras de se medir o grau de hidrólise e é vantagem usar a porcentagem de grau de hidrólise (%GH) como parâmetro de processo, o que surge para determinar, sem erro, a propriedade da proteína hidrolisada para um dado sistema proteína-enzima (SPELLMAN et al., 2003). Esse parâmetro pode ser quantificado pela determinação da quantidade de nitrogênio libertado durante a hidrólise, a qual se torna solúvel, na presença de um agente de precipitação (ácido tricloroacético). Outro modo é através da determinação dos grupos aminos livres, libertados durante a hidrólise por meio de titulação com formol, ou utilizando compostos que reagem especificamente com grupos aminos, tais como ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), o-phthaldialdeído (OPA), ninidrina ou fluorescamina.

Alternativamente, no método pH-stat os prótons libertados durante a hidrólise são titulados e em seguida relacionados com o GH (SPELLMAN et al., 2003). Essa técnica é realizada em condições neutras ou alcalinas, pois a libertação de prótons conduz à diminuição do pH da mistura de reação. O número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado a partir da quantidade de base necessária para manter um determinado pH constante durante a reação (Adler-Nissen, 1986).

Bandyopadhyay; Misra; Ghosh (2008) trabalhando com isolamento de proteína do farelo de arroz indiano desengordurado realizaram a hidrólise com Papaina, verificando as propriedades funcionais do isolado e de cinco hidrolisados, obtidos com diferentes tempos de hidrólise, comprovando que houve melhorias nas respostas em relação ao aumento do tempo de hidrólise da proteína isolada. Zhang et al. (2012) também estudaram as propriedades funcionais das proteínas do farelo de arroz desengordurado estabilizado pelo aquecimento. A fração insolúvel, proveniente do processo de concentração das proteínas, foram hidrolisadas com a enzima Alcalase 2.4 L, sendo que o hidrolisado apresentou melhores propriedades emulsificantes, espumantes e absorção de água e de óleo, comparado com o isolado, aumentando o campo de aplicação deste produto em alimentos.

### 3.7 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Enzimas são proteínas que catalisam quase todas as reações bioquímicas existentes no organismo humano. Através do complexo enzima-substrato, a ligação do substrato se torna seletiva e sua estrutura é submetida a uma força com alta energia intermolecular, causando a quebra das ligações e formando os produtos e o complexo enzima-produto (CALVEY, 2004).

As proteases são enzimas que atuam na quebra de ligações peptídicas presente nas proteínas e, dependendo da sua especificidade, podem afetar o tamanho, a quantidade, a composição de aminoácidos livres, peptídeos e a sequência de aminoácidos que a compõem (WU; CHEN; SHIAU, 2003). Na indústria alimentícia podem ser utilizadas enzimas proteolíticas de origem animal e microbiana (bactérias e fungos). Para que sejam comercializadas, estas enzimas recebem a classificação de “grau alimentício”, sendo inócuas e seguras para aplicação na indústria de alimentos (GUADIX et al., 2000). Segundo Guadix et al. (2000) e Torruco-Uco et al. (2008), as proteases podem ser classificadas de acordo com:

- *Origem:* animal, vegetal ou microbiana.

- *Ação catalítica*: endopeptidases ou proteinases, atacando o interior das cadeias polipeptídicas; e em exopeptidases ou peptidases, atacando apenas os aminoácidos e peptídeos das extremidades da cadeia polipeptídica.
- *Natureza de seu sítio catalítico*: as endopeptidases são específicas para certos aminoácidos que se encontram no interior da cadeia polipeptídica, dependendo de cada enzima; as exopeptidases, por exemplo, são específicas para grupamentos amino e carboxílico terminal.

Conforme Damodaran, Parkin e Fennema (2010) as endopeptidases geralmente são utilizadas quando se deseja diminuições rápidas da massa molecular média de peptídeos, enquanto que as exopeptidases são destinadas à hidrólise de oligopeptídeos para transformá-los em aminoácidos.

Diferentes proteases têm sido aplicadas em matérias primas de origem vegetal: folhas de alfafa hidrolisadas com a enzima Alcalase (XIE et al., 2008); a proteína do milho, a zeína, hidrolisada com Pepsina, Pancreatina e Alcalase ( ZHU et al., 2008); a farinha de milho utilizando a enzima Alcalase (LI; HAN; CHEN, 2008); a proteína de soja submetida à ação da Flavourzyme (MOURE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2006); o endosperma do arroz com diferentes enzimas, como a Alcalase, Quimiotripsina, Neutrase, Papaina e Flavourzyme (ZHANG et al., 2010).

### 3.7.1 Alcalase

A Alcalase é uma enzima microbiana produzida por fermentação submersa do *Bacillus licheniformis* e foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes (KRISTINSSON; RASCO, 2000). O principal componente enzimático, a subtilisina, é considerado uma endoprotease do tipo serina e tem uma ampla especificidade de substrato, podendo hidrolisar a maioria das ligações peptídicas dentro de uma molécula de proteína (IUBMB, 2015).

Conforme citado por Hedstrom (2002), o sítio ativo da enzima apresenta uma tríade composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico e cada um desses aminoácidos executa uma tarefa específica no processo de hidrólise:

- A serina possui o grupamento  $\text{OH}^-$  que atua como nucleófilo atacando o carbono do grupamento carboxílico que participa de ligação peptídica;

- Um par de elétrons do nitrogênio da histidina é capaz de aceitar o hidrogênio do grupo OH<sup>-</sup> da serina, iniciando a formação de um intermediário tetraédrico, seguida da quebra da ligação peptídica;
- O grupo carboxílico do ácido aspártico, no entanto, interage com a histidina através de ligações de hidrogênio, fazendo com que o átomo de nitrogênio mencionado acima se torne mais eletronegativo.

### 3.7.2 Flavourzyme

A enzima Flavourzyme é uma mistura de proteases produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* que não foi geneticamente modificada, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (ŠLIŽYTE et al., 2005). Merz et al. (2015) realizaram um trabalho de identificação das enzimas produzidas pelo *Aspergillus oryzae*, estudo que proporcionou uma melhor compreensão do complexo enzimático e permitiu a melhor utilização da enzima em diferentes substratos. Foram encontradas 8 enzimas: 2 aminopeptidases, 2 dipeptidil peptidase, 3 endopeptidases e 1  $\alpha$ -amilase. É vendida como um mix de aminopeptidase com pelo menos 1000 LAPU/g (leucine aminopeptidase units/g), determinado pela Leu-pNA (Leucina-p-nitroanilida). Como sugere o nome Flavourzyme, são produzidos compostos flavo-ativos de várias fontes proteicas.

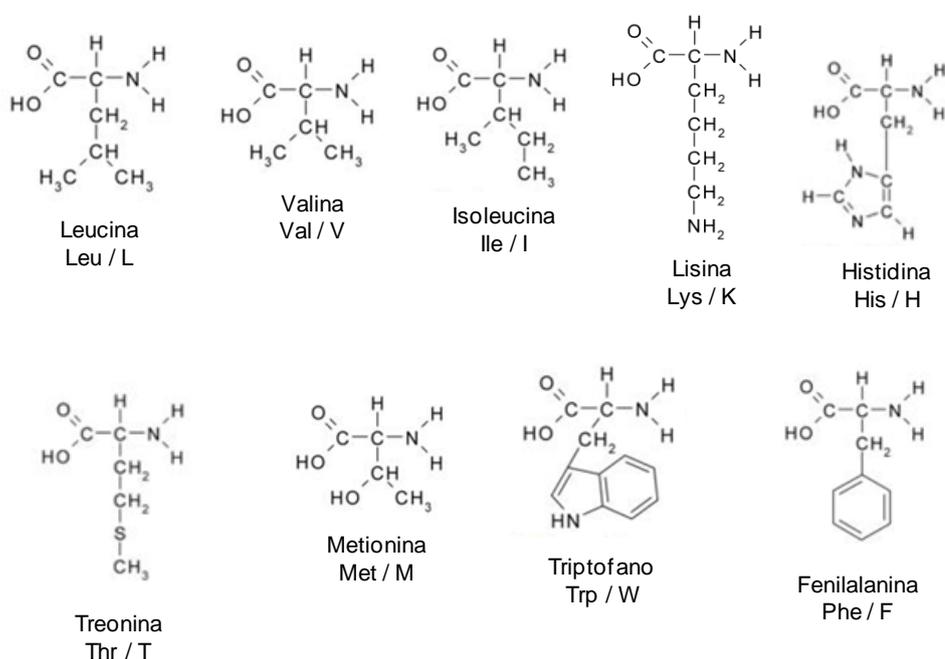
As enzimas identificadas por Merz et al. (2015) foram Protease neutra 1 (NP1), Protease neutra 2 (NP2) e Protease alcalina 1 (ALP1), sendo essas endopeptidases; as duas aminopeptidases foram a Aminopeptidase de leucina A (LAPA) e a Aminopeptidase de leucina 2 (LAP2); duas dipeptidil peptidases, como a Dipeptidil peptidase 4 (DPP4) e a Dipeptidil peptidase 5 (DPP5); e, por fim, uma amilase que foi a  $\alpha$ -Amilase A do tipo 3 (AMY3). Esse

## 3.8 PEPTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos, peptídeos e proteínas são componentes importantes dos alimentos por proporcionarem os elementos necessários para a síntese proteica e por contribuem diretamente para seu sabor. São precursores dos componentes aromáticos e substâncias coloridas que se formam mediante as reações térmicas ou enzimáticas que ocorrem durante a obtenção, preparo e armazenamento dos mesmos (BELITZ e GROSCH, 1997). As proteínas do nosso corpo são derivadas de 20 aminoácidos, onde a partir destes, 12 são sintetizados pelo nosso

próprio organismo e, os outros 8 restantes devem ser provenientes de fontes externas, ou seja, da nossa dieta. Estes são considerados os aminoácidos essenciais para podermos desencadear todas as nossas funções metabólicas (GOLDHMAN,2009). Na Figura 8 estão ilustrados os aminoácidos considerados nutricionalmente indispensáveis, como a leucina, valina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e fenilalanina. A histidina é essencial durante a infância e, após adultos, passa a ser sintetizado pelo próprio organismo.

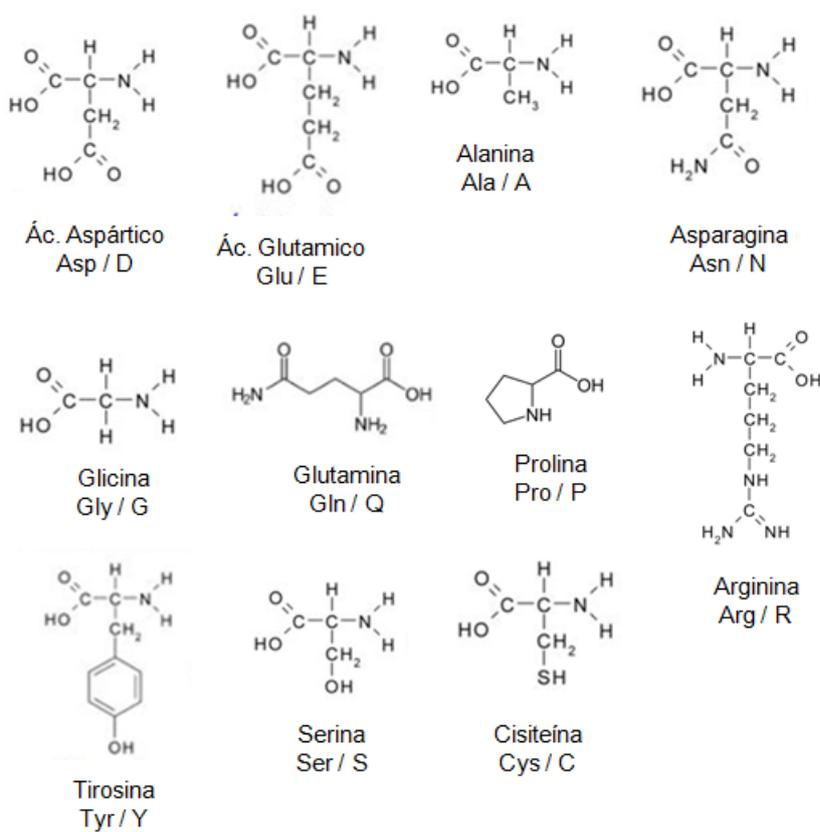
**Figura 8-** Estrutura molecular, nome e nomenclaturas dos aminoácidos essenciais.



Na Figura 9 estão apresentados os aminoácidos considerados não essenciais, pois são produzidos pelo nosso metabolismo. Os aminoácidos não essenciais são o ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, asparagina, glicina, glutamina, prolina, arginina, tirosina, serina, cisteína.

Enfim, nestas discussões relacionadas à dieta de proteínas deve-se considerar não somente a quantidade, mas também a qualidade da proteína que se consome (WATFORD; WU, 2011). Tem-se evidenciado há algum tempo a atividade biológica de peptídeos e proteínas derivadas de alimentos que tem efeitos benéficos à saúde humana (MÖLLER et al, 2008).

**Figura 9-** Estrutura molecular, nome e nomenclaturas dos aminoácidos não essenciais.



### 3.9 A PROPRIEDADE BIOATIVA DOS PEPTÍDEOS

Substâncias bioativas são definidas como componentes que podem afetar o processo biológico e, por isso, tem um impacto na função e condição do corpo, ou seja, na saúde (MÖLLER et al., 2008). A bioatividade de peptídeos é encontrada na estrutura primária de proteínas de fontes animal e vegetal, que são inativas dentro da sequência proteica e podem ser liberados com processos de fermentação, processamento ou hidrólise enzimática, *in vitro* ou *in vivo* (HARTMANN; MEISEL, 2007). Vários fatores afetam as propriedades bioativas destes peptídeos, incluindo as enzimas utilizadas na hidrólise, as condições de processamento (tempo de hidrólise, o grau de hidrólise, a razão enzima-substrato), o tamanho dos peptídeos resultantes, o que afeta muito sua absorção através dos enterócitos e biodisponibilidade em tecidos-alvo, além dos pré-tratamentos na proteína anterior à hidrólise. Em muitos casos o tratamento térmico pode facilitar a hidrólise enzimática possivelmente pela melhor interação da enzima na proteína, devido ao seu desdobramento pelo calor. Também podem ser utilizadas a sonicação e tratamento com pressão (INOUYE et al., 2009; QUIRÓS et al., 2007; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

A proteína de muitos alimentos, proveniente de animais e plantas, tem sido explorada como fontes de peptídeos bioativos. Diversos estudos foram conduzidos com proteínas animais como as do leite, a caseína, o ovo e o pescado (GARCIA-REDONDO et al., 2010; MANSO et al., 2008; MIGUEL et al., 2009; MUGUERZA et al., 2006; CENTENARO; MELLADO; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2011; CENTENARO et al., 2014; PIOTROWICZ; MELLADO, 2015). Proteínas de plantas também são utilizadas para a produção de peptídeos bioativos como a soja, arroz, farelo de arroz, feijão (BOONLA et al., 2015; KANNAN; HETTIARACHCHY; MAHEDEVAN, 2012; KARAS et al., 2014; PUCHALSKA; MARINA; GARCÍA, 2014; UDENIGWE; ALUKO, 2012; ZHANG et al., 2010)

As propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos são: antioxidante, anti-hipertensiva, imunomoduladora, anticâncer, antimicrobiana, hipocolesterolêmica, antidiabética, vasodilatadora e outras (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; MEISEL, 2004; MIGUEL, 2004; GARCÉS-RIMÓN, 2013; WANG; GONZALEZ DE MEJIA, 2005). A especificidade desses composto bioativos contra as doenças depende primeiramente das propriedades estruturais das proteínas como o comprimento da cadeia e características físico-químicas dos resíduos de aminoácidos, como a hidrofobicidade, carga molecular e a cadeia lateral (PRIPP et al., 2005). O mecanismo exato da atividade antioxidante de peptídeos ainda não é bem compreendido. Muitos estudos mostram que existem peptídeos com propriedades inibidoras da peroxidação lipídica, outros sequestradores de radicais livres e quelante de íons metálicos (MOURE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2006; RAJAPAKSE et al., 2005). Além disso, tem sido reportado por Erdmann; Cheung; Schröder (2008) que peptídeos antioxidantes mantêm as células salvas de danos por espécies reativas de oxigênio (ROS).

Tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteína e histidina são exemplos de aminoácidos antioxidantes. Aminoácidos com resíduos aromáticos podem doar prótons para radicais deficientes de elétrons (PIHLANTO, 2006). Peptídeos que contém resíduos de histidine apresentam propriedade antioxidante, pela doação do hidrogênio, além da capacidade de retenção de radicais peróxido e/ou a habilidade quelante de metais, apresentada pelo grupo imidazol (RAJAPAKSE et al., 2005). Além disso, o grupo -SH da cisteína tem ação antioxidante importante devido a sua interação direta com radicais (QIAN; JUNG; KIM, 2008). Zhang et al. (2010) obtiveram peptídeos do endosperma do arroz que continham os resíduos de aminoácidos do tipo Phe-Arg-Asp-Glu-His-Lys-Lys e Lys-His-Asp-Arg-Gly-Asp-Glu-Phe que apresentaram maior capacidade de sequestro do radical livre DPPH, um método muito utilizado para avaliar a propriedade antioxidante dos peptídeos.

Peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) geralmente apresentam poucos aminoácidos na sequência, apresentando resíduos de aminoácidos polares como a Prolina. Estudos realizados por Inducible et al., (2003) demonstraram que o sítio ativo da ECA não acomoda moléculas grandes. O carbono terminal de um tripeptídeo tem forte influência na ligação do substrato ou um inibidor que compete pelo sítio ativo da enzima. Há indicações de que a ECA tem afinidade com substratos ou inibidores contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou com cadeias laterais ramificadas) em cada uma das três posições do carbono terminal. Os peptídeos identificados como efetivos inibidores da ECA apresentam tirosina, fenilalanina, triptofano e/ou prolina no carbono terminal. Além disso, dados da estrutura sugerem que a carga positiva da lisina e arginina, como resíduo de carbono terminal, deve contribuir para o potencial inibitório (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2013). Cian; Vioque; Drago (2015) verificaram as propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas de hidrolisados de glúten de trigo, obtendo atividades relevantes em peptídeo com massa molar de 5,5 kDa. Yang et al., (2011) obtiveram peptídeos de germe de trigo, os quais foram identificados quatro peptídeos (VEV, NPPSV, QV, AMY) e um aminoácido (W) com propriedade anti-hipertensiva relevante.

### 3.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo ocorre devido a formação de radicais livres através das reações ocorrentes no próprio corpo durante a respiração (JE et al., 2007). Além da produção fisiológica de oxidantes e suas reações secundárias, existem outras fontes para a produção desses compostos. A oxidação de óleos e gorduras durante o processamento e armazenamento de alimentos pioram a qualidade de seu conteúdo lipídico e seu valor nutritivo (RAJAPAKSE et al., 2005). O consumo destes elementos tóxicos pode causar diversas doenças (JE et al., 2007). Poluentes atmosféricos e oxidantes em tabaco pode também causar reações prejudiciais na pele ou podem ser absorvidos para a circulação sanguínea e exercer efeitos adversos (BOFFETTA; NYBERG, 2003).

Os radicais livres, que são produzidos fisiologicamente, podem exercer funções diversas, como de sinalização e de fornecimento de defesa contra as infecções (VALKO et al., 2007). No entanto, qualquer quantidade excessiva de radicais reativos pode resultar em danos celulares que, por sua vez, pode dar início a várias doenças, incluindo a aterosclerose, artrite, diabetes, cardiovasculares e cancro (HALLIWELL, 1994).

De acordo com a teoria do envelhecimento devido à presença de radicais livres, desenvolvida por Denham Harman, os organismos envelhecem quando os radicais livres se acumulam nas células e causam danos ao longo do tempo (HARMAN, 2001). Geralmente, as espécies reativas podem causar danos nas proteínas e mutações no DNA, oxidação dos fosfolípidos da membrana e a modificação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (LEE; KOO; MIN, 2004; ALAIZ et al., 1994). Sob condições normais, os sistemas de defesa antioxidante podem remover espécies reativas através de antioxidantes enzimáticos (como a superóxido dismutase e glutatona peroxidase) e não enzimáticos (tais como vitaminas antioxidantes, oligoelementos, coenzimas e cofatores) (JOHANSEN et al., 2005).

Em função dos problemas causados pela oxidação e formação de radicais livres é importante conhecer e aplicar substâncias capazes de diminuir esses processos oxidativos em alimentos e no metabolismo humano. Na ciência de alimentos, antioxidantes são componentes capazes de diminuir ou inibir a oxidação de um substrato quando presente em baixíssimas quantidades comparada com o substrato. Antioxidantes sintéticos como o BHT (Hidróxitolueno butilato) e BHA (Hidróxianisol butilato) e outros são utilizados em alimentos para retardar a oxidação, que são mais efetivos e baratos comparado com os naturais, porém o seu uso deve ser limitado pois muitos são suspeitos de serem carcinogênicos. Por isso tem aumentado as pesquisas na busca de novos elementos com propriedades antioxidantes provenientes de fontes naturais (WATTANASIRITHAM et al., 2016).

### **3.10.1 Técnicas de Determinação das Propriedades Antioxidantes**

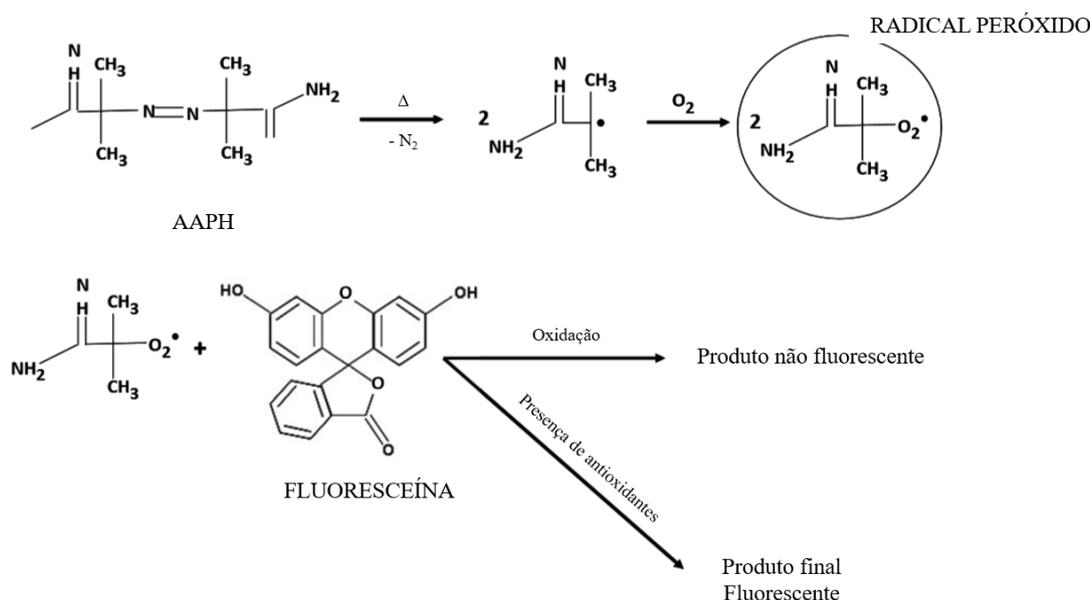
Existem diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante em componentes alimentares. Como citado por Goufo e Trindade (2014), dependendo do mecanismo de reação, os métodos podem ser divididos em cinco grupos baseados em:

1. Prevenir a etapa de iniciação: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), sequestro do radical ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), atividade quelante do íon ferroso ( $Fe^{2+}$ );
2. Inibir a formação do peróxido: inibição da auto-oxidação do ácido linoleico.
3. Prevenir a continuação da abstração do hidrogênio: inibição da formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS);
4. Capacidade de redução: poder redutor, capacidade de redução do molibdato, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), sequestro do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl);

5. Capacidade de sequestro do radical oxigênio: peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), oxigênio singlete, terc-butil peróxido.

O radical peroxil é um oxidante comumente encontrado em substratos biológicos. Neste ensaio o radical peroxil, gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente que vai perdendo a fluorescência conforme ocorre a inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio (ALVES et al., 2010), conforme ilustrado na Figura 10.

**Figura 10-** Oxidação da fluoresceína pelo radical peroxil.



Fonte: Ou; Hampsch-Woodill; Prior (2001).

O poder redutor é outro método utilizado baseado na capacidade do antioxidante reduzir o íon ferricianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) a ferrocianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) que, ao reagir com o íon férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), forma um composto azul prússia devido à habilidade do antioxidante de transferir um elétron para a redução do radical, intermediários oxidados por processos de peroxidação lipídica (SUN; TANUMIHARDJO, 2007; OYAIKU, 1986).

Wattanasiritham et al. (2016) trabalharam com frações de albumina (12,5%), glutelina (70,8%), globulina (13,9%) e prolamina (2,9%) isoladas da proteína de farelo de arroz denominado Khao Dawk Mali 105, hidrolisadas pela Papaína e Tripsina, analisando a

propriedade antioxidante através do ensaio de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), onde a fração albumina hidrolisada pela tripsina foi a que apresentou maior atividade dentre as outras amostras. Este hidrolisado foi fracionado e analisado em RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography). Os peptídeos com melhores propriedades apresentaram massas molares de 800 a 2100 Da, consistindo em uma sequência de 6 a 21 aminoácidos.

### 3.11 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Doenças cardiovasculares são o maior problema nos países industrializados, representando a principal causa de doenças no mundo (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2013). Hipertensão é uma desordem comum que, se não tratada efetivamente resulta em um aumento da probabilidade de trombose coronária, derrames e falhas renais. É definida convencionalmente como um aumento sustentado de pressão sanguínea quando for maior de 140/90 mm Hg, um critério que caracteriza um grupo de pacientes cujo risco de hipertensão, relacionada com a doença cardiovascular, é alta o suficiente para merecer a atenção médica (JOSHI; DAHAKE; SUTH, 2010). Conforme a última atualização do Instituto Nacional do Coração (INC), em 2015, os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) variam, evoluindo de uma pré-hipertensão até uma pressão alta no estágio 2, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1-** Estágios da pressão alta em Adultos (INC, 2015).

Estágios	PAS	PAD
Pré-hipertensão	120-139	80-89
Pressão alta estágio 1	140-159	90-99
Pressão alta estágio 2	160 ou maior	100 ou maior

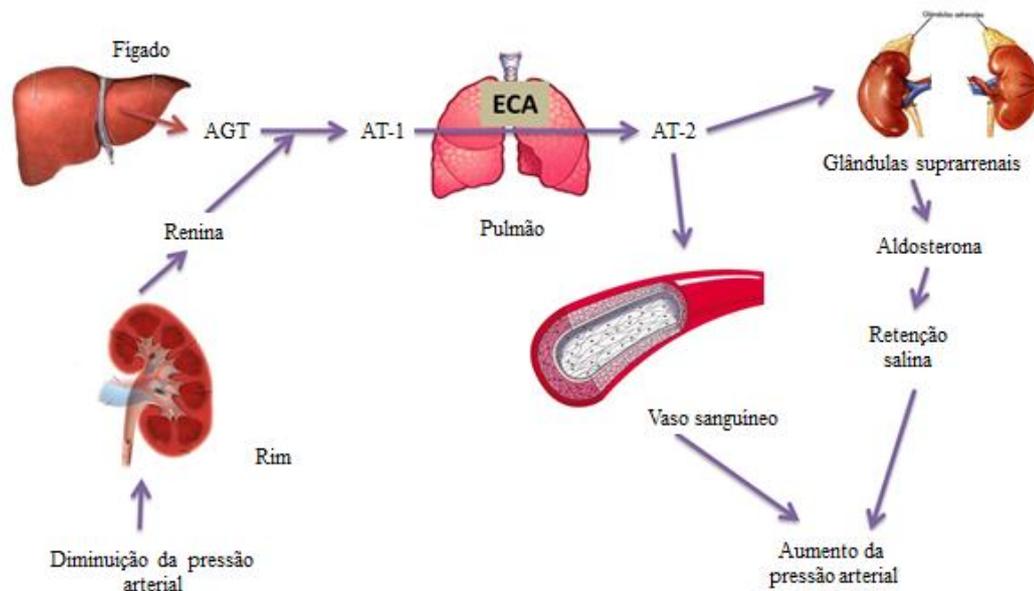
PAS: pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica.

Fonte: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hbp/>

Na Figura 11 está ilustrado o esquema de ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Em função da redução de sódio nos túbulos renais ou da queda de pressão, a enzima renina, produzida pelo aparelho justaglomerular dos rins, é liberada na corrente sanguínea e atua no angiotensinogênio (AGT), removendo o nitrogênio terminal da proteína de origem hepática. O substrato é então transformado em um decapeptídeo, sem nenhum efeito fisiológico, conhecido como Angiotensina-I (AT-I). A AT-1, ao ser hidrolisada

pela enzima conversora da angiotensina (ECA), produz a angiotensina II (AT-2). A ECA desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial e está presente nas células endoteliais, principalmente do pulmão. Dentro do renina-angiotensina a ECA é uma enzima metalopeptidase que atua como uma carboxipeptidase (dipeptidase) sobre inúmeros substratos. Esta enzima remove o carbono terminal do dipeptídeo e converte a AT-1 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) em AT-2 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), que resulta em vasoconstrição e regulação dos níveis de sódio e há um aumento da pressão arterial. A AT-2 é o estímulo primário para a produção da aldosterona no córtex suprarrenal, promovendo a reabsorção de água e sódio dos túbulos renais e se eleva o volume intravascular (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2013; LI et al., 2004; MÖLLER et al., 2008b; TORRUCO-UCO et al., 2008).

**Figura 11-** Ilustração do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

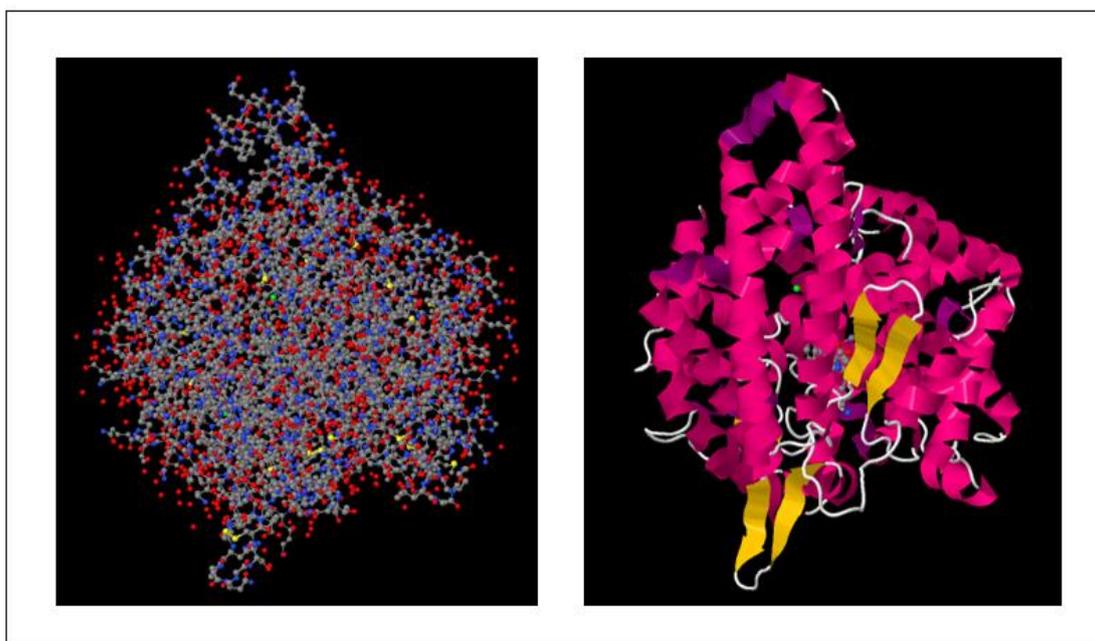


Fonte: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Renina&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Renina&lang=3)

Todas essas transformações provocam o aumento da pressão arterial, e conseqüentemente o sistema de retroalimentação negativa provoca a diminuição da excreção da renina. Quando existe a hipertensão arterial, o sistema de retroalimentação negativa pode não funcionar, levando a uma produção excessiva de AT-2, havendo a persistência da pressão alta. A ECA degrada também a bradiquinina que possui a propriedade vasodilatadora (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2013; LI et al., 2004; MÖLLER et al., 2008; TORRUCO-UCO et al., 2008).

Os fármacos que contêm peptídeos inibidores da ECA são geralmente usados para o tratamento da hipertensão e da regulação da pressão arterial, no entanto eles são caros e têm sido associados a diversos efeitos colaterais (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008). A demonstração do primeiro inibidor da ECA (IECA) ocorreu, em 1975, com a descoberta do captopril, fato que propiciou, posteriormente, o aparecimento de novos componentes, também integrados na prática médica como IECA, denominados, sucessivamente, de enalapril e lisinopril (FARAJ, 2005). Na Figura 12 está ilustrada a estrutura cristalina da ECA complexada com lisinopril, conhecido como um inibidor da enzima.

**Figura 12-** Estrutura cristalina da Enzima Conversora da Angiotensina complexada com lisinopril.



Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1O86>

A hipotensão grave pode ocorrer após as doses iniciais de qualquer medicamento inibidor da ECA em pacientes que são hipovolêmicos (diminuição do volume do plasma sanguíneo) devido aos diuréticos, a restrição de sal, ou a perda de fluido gastrointestinal. Outros efeitos adversos comuns a todos os inibidores da ECA incluem falência renal aguda, hipercalemia (nível elevado de potássio no sangue), tosse seca, e angioedema (edema sob a pele). O Captopril, particularmente quando administrado em doses elevadas em pacientes com insuficiência renal, pode causar neutropenia (redução dos neutrófilos circulantes) ou proteinúria (perda excessiva de proteína pela urina). Menores efeitos tóxicos vistos mais

tipicamente incluem sentido do paladar alterado, erupções cutâneas alérgicas e febre, que pode ocorrer em até 10% dos pacientes (JOSHI et al., 2011).

Tem sido demonstrado que a hipertensão está fortemente associada com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), pois o superóxido é capaz de inativar o óxido nítrico (NO), reduzindo a sua biodisponibilidade e a inibição da produção de NO, estimula a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) que está ligado ao controle da pressão arterial e o equilíbrio eletrolítico (SHAH; CHANNON, 2004).

### **3.11.1 Determinação in vitro da atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (IECA)**

Diferentes técnicas analíticas são utilizadas para a avaliação da propriedade inibidora da ECA (CUSHMAN; CHEUNG, 1971; VERMEIRSSSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE, 2002). Uma das primeiras técnicas utilizadas para avaliar a inibição da ECA foi a desenvolvida por Cushman; Cheung, (1971), baseada na hidrólise do substrato HHL (Hipuril-Histidil-Leucina) pela ECA e a consequente produção do Dipeptídeo histidil-leucina e ácido hipúrico. O ácido foi medido através de um espectrofotômetro a 228 nm após a sua extração com acetato de etila. A quantificação do ácido hipúrico também pode ser feita em HPLC, porém é necessário muito tempo para a sua avaliação(WU; DING, 2002).

Vermeirssen; Van Camp; Verstraete (2002) realizaram a validação e otimização do método de inibição da ACE determinado pelo deslocamento do espectro de absorção para o azul que ocorre após a hidrólise de um tripeptídeo furanacryloyl (FA-Phe-Gly-Gly / FAPGG), levando à produção do aminoácido correspondente (FA-Phe / FAP) e o dipeptídeo (Gli-Gli / GG). A libertação destes peptídeos diminui a absorbância no comprimento de onda pré-determinado.

Outro método para determinar a atividade inibitória sobre a ACE é o ensaio fluorescente com alta precisão e sensibilidade. O método está baseado na diminuição da capacidade da ACE de hidrolisar o substrato O-aminobenzoil glicil-p-nitro-L-fenilalanil-L-prolina, gerando o produto fluorescente O-aminobenzoil glicina, possibilitando a sua análise através do fluorímetro. O método apresenta vantagens em relação a outros ensaios, porque envolve apenas um reagente, é fácil de efetuar e permite a análise de um número elevado de amostras em uma hora e meia, quando se utiliza uma placa de multi-poços (QUIRÓS et al., 2009; SENTANDREU; TOLDRÁ, 2006).

Yang et al., (2011) obtiveram peptídeos de germe de trigo, onde o peptídeo AMY apresentou-se mais eficaz na inibição de 50% da atividade da enzima conversora da angiotensina (IC<sub>50</sub>). Wan Mohtar et al. (2014) estudaram a hidrólise de uma espécie de feijão (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) com as enzimas Alcalase, Flavourzyme, Papaina e Bromelina em diferentes tempos de hidrólise, onde os peptídeos obtidos com as enzimas Alcalase e Flavourzyme apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de 0,374 e 0,377 mg de hidrolisado/mL, respectivamente.

### 3.12 DETERMINAÇÃO IN VIVO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA

#### 3.12.1 Modelos animais

Os conhecimentos gerados em modelos animais nem sempre são plenamente transponíveis ao ser humano. Os animais devem ser encarados como reagentes biológicos, portanto serem os mais puros possíveis e livres de contaminantes. Para que eles sejam designados como “modelo experimental” devem ter características desejáveis ao pesquisador e, o pesquisador deve ter conhecimento da espécie de interesse para desenvolver o seu trabalho (BENITES, 2009).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão arterial vêm sendo estudados desde 1927, segundo a descrição feita por Hering, quando um dos primeiros modelos animais foi proposto a partir da desnervação sino-aórtica. Desde então, devido a sua origem multifatorial, os mais diversos modelos experimentais de hipertensão arterial já foram descritos. Cada modelo aborda um ou mais dos fatores causais envolvidos nessa patologia como, por exemplo, hiperatividade simpática, hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA), retenção de sódio, dentre outros (FAZAN; SILVA; SALGADO, 2001).

Um dos mais estudados modelos para investigar os efeitos de alimentos bioativos sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na hipertensão arterial é o de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). MIGUEL et al., (2010) estudaram os efeitos de peptídeos da caseína do leite em ratos SHR para avaliar o impacto da digestão gastrointestinal na estabilidade e bioatividade de peptídeos e verificar se outro mecanismo, diferente da inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), poderia estar envolvido na atividade anti-hipertensiva apresentada pelos peptídeos. Os resultados indicaram que os peptídeos

inibidores de ECA, ou os produtos gerados pela digestão gastrointestinal, podem ser eficientemente, absorvidos através do intestino dos animais em uma forma ativa e com um potencial benéfico na prevenção e tratamentos da hipertensão ou outras doenças associadas. Chen; Tsai; Sun Pan (2007) estudaram a ação de peptídeos de arroz purificados em ratos SHR, verificando assim a diminuição da pressão arterial e visando a sua aplicação como alimento funcional ou farmacêutico, visto que apresentou um alto potencial antioxidante e anti-hipertensivo. Outro modelo animal para o estudo da hipertensão é conhecido como Wistar-Kyoto (WKY), o qual é oriundo da mesma cepa do modelo SHR, porém não desenvolve a hipertensão espontânea. Esse modelo é utilizado como controle normotenso dos ratos SHR, por apresentar a mesma origem e carga genética.

O modelo animal de ratos WKY tem sido usado para avaliar o efeito de peptídeos alimentares sobre a pressão arterial, onde o efeito hipotensivo não deve ser observado nesse. Miguel et al. (2005) estudaram o efeito de hidrolisados de ovo em ratos WKY e foi verificada que a pressão, mesmo se apresentando um pouco elevada, ainda era muito diferente dos SHR, comprovando que não houve efeito dos hidrolisados na redução da pressão dos ratos WKY.

O modelo de rato duplo transgênico (dTGR) tem sido utilizado para o estudo de inibidores da renina humana e da hipertensão arterial durante a gestação. Esse modelo desenvolve hipertensão, hipertrofia cardíaca, danos renais e disfunção endotelial devido ao aumento da formação da Angiotensina II (CARVALHO et al., 2001; JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010; OGNIBENE et al., 2009).

Ratos Goto-Kakizaki (GK) são caracterizados por uma diminuição na secreção de insulina induzida pela glicose, regulação anormal da glicose, resistência à insulina e poliúria (produção excessiva de urina). Eles são normotensos, porém ao consumirem uma dieta rica em sal podem desenvolver hipertensão. O efeito do leite fermentado contendo lactotripeptídeo sobre a pressão sanguínea e a função vascular de ratos GK diabéticos do tipo II foram analisados por Jäkälä et al. (2009), mostrando a diminuição significativa na pressão sanguínea e maior relaxamento dependente do endotélio das artérias mesentéricas.

Estudos em ratos 2K-1C (2-kidney, 1-clip) foram realizados por Boonla et al. (2015). Esses ratos desenvolvem a hipertensão em função da alta produção e circulação de renina e Angiotensina II gerada através da ação da ACE. Foi utilizada linhagem de ratos Sprague-Dawley, submetidos a uma operação para a colocação de um clipe de prata (0,2 mm) ao redor da artéria renal. Animais que apresentaram a pressão arterial sistólica maior que 140 mmHg medidos por *tail-cuff*, uma semana depois da operação, foram considerados hipertensos.

Com relação ao uso dos modelos animais de hipertensão para investigação dos efeitos de componentes bioativos oriundos da dieta, existe uma grande variedade de estudos relacionados à ação de diferentes tipos de peptídeos na pressão sanguínea. Isso se deve às diferentes fontes de peptídeos, aos diferentes modelos animais experimentais, à dosagem de peptídeos requeridos para a diminuição significativa na pressão arterial, à duração do experimento (agudo ou crônico) e à via da administração (oral ou intravenosa). Em geral, tem sido encontrado que peptídeos administrados pela via intravenosa produzem a diminuição maior na pressão sanguínea, comparada com os administrados oralmente. Esse comportamento pode estar relacionado com a menor biodisponibilidade desses peptídeos tanto na corrente sanguínea, como no transporte desses peptídeos através da membrana. Além disso, a hidrólise parcial desses peptídeos, pelas enzimas gastrointestinais ou do soro, pode inativar ou diminuir a atividade hipotensiva dos peptídeos (MURRAY; FITZGERALD, 2007).

### **3.12.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**

Estudos iniciais *in vivo* com um modelo de hipertensão espontânea foram realizados em uma cepa de ratos da Nova Zelândia, que apresentavam hipertensão genética (Genetic Hypertension – GH). Em 1963, foi desenvolvida uma nova cepa por Okamoto e Aoki, conhecidos como os ratos espontaneamente hipertensos (Spontaneously Hypertensive Rat - SHR), sendo desde então um dos modelos mais estudados. Isto ocorre em função da sua fisiopatologia ser similar à hipertensão essencial (primária) do homem (FAZAN; SILVA; SALGADO, 2001). A hipertensão essencial resulta de uma interação complexa entre o fator genético e a exposição ambiental. É poligênica e tem interação com sistemas integrados, incluindo a renal, neural, hormonal e vascular (FOLTZ et al., 2007).

Okamoto; Aoki, (1963) fizeram cruzamentos entre irmãos de ratos Wistar que possuíam níveis de pressão mais altos que o normal. A partir da sexta geração conseguiram uma nova raça de ratos, os SHR, onde a pressão arterial sistólica alcançou valores superiores a 190 mmHg. Os autores comprovaram também que não se poderia considerar que a pressão desses animais estivesse estável até 20 semanas de vida. A expectativa de vida dos ratos SHR, em condições normais de cuidado e mantimento, é de 18 meses. O controle normotenso dos SHR, os ratos Wistar criados na Universidade de Kyoto, conhecidos como Wistar-Kyoto (WKY), são considerados por alguns investigadores como pré-hipertensos. Essa raça de ratos costuma viver, em condições normais, em torno de 24 meses (WRIGHT; RANKIN, 1982).

Existem algumas diferenças entre a pressão arterial humana e dos ratos SHR. Pacientes hipertensos normalmente têm excesso de peso, comparadas com as pessoas normotensas. No entanto, os ratos SHR pesam menos que os WKY. Além disso, os ratos SHR apresentam alterações na função da tireóide que nem sempre é percebido por pacientes com hipertensão. No ponto de vista terapêutico, existem sinais de que ratos SHR não apresentam uma resposta hipotensora aos diuréticos, contrário às pessoas hipertensas nas quais o uso destes fármacos é imprescindível para a redução da pressão arterial. Com relação à arteriosclerose, que normalmente está presente em pessoas hipertensas, o mesmo não ocorre com os ratos SHR (TRIPPODO; FROHLICH, 1981).

### 3.13 FUNÇÃO ENDOTELIAL E REATIVIDADE VASCULAR

O endotélio é uma camada monocelular contínua que recobre internamente os vasos sanguíneos e válvulas cardíacas, e desempenha um papel importante no controle do tônus vascular através da síntese e liberação de vários fatores relaxantes e constritores mantendo, assim, o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição (EHLERS et al., 2011; MICHEL; VANHOUTTE, 2006). Experimentos farmacológicos demonstram que é indispensável a presença de endotélio intacto para que os vasos sanguíneos respondam a estímulos vasodilatadores como a acetilcolina (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989).

A presença do endotélio cobrindo a superfície vascular permite a sua ação como sensor de alterações hemodinâmicas, respondendo a esses fatores com a produção e liberação de substâncias químicas, com objetivo de regular as funções das células do músculo liso vascular e células circulantes no sangue. Essas substâncias incluem, como vasodilatadoras, o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), bradicinina; e como vasoconstritoras a endotelina, os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase e a angiotensina II (MATURANA; IRIGOYEN; SPRITZER, 2007; VERMA; BUCHANAN; ANDERSON, 2003).

A correta regulação das funções do músculo liso vascular é dependente diretamente da integridade do endotélio vascular. A disfunção endotelial, a qual pode ocorrer na presença de fatores oxidativos e inflamatórios, é considerada a fisiopatologia inicial para o desenvolvimento da maior parte das disfunções cardiovasculares e cardiometabólicas conhecidas. A disfunção endotelial corresponde à incapacidade do endotélio em promover o relaxamento vascular, devido à redução da produção ou da biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, principalmente do

NO. Situações de disfunção endotelial comprometem a atividade normal da musculatura lisa vascular promovendo o aumento da reatividade vascular, a ocorrência de hipertensão arterial além de comprometimento cardíaco (MICHEL; VANHOUTTE, 2006).

A reatividade estuda o comportamento do músculo liso vascular aos estímulos provocados pela presença de substâncias endógenas ou exógenas. Esta análise se conduz em artérias de resistência (mesentéricas) e em artérias de condutância (aorta) extraídas de animais submetidos ou não a determinados tratamentos (PEÇANHA, 2009; PEÇANHA, 2008). Mediante o contato das artérias às drogas vasoconstritoras ou vasodilatadoras, podemos observar a sensibilidade das células musculares lisas ao responderem a esse estímulo. O aumento exagerado da contração ou redução do relaxamento da musculatura lisa vascular ocasionado por substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, respectivamente, indicam alterações na reatividade vascular do leito analisado. A partir do estudo da reatividade vascular podemos identificar possível disfunção endotelial e conseqüente comprometimento da função normal da musculatura lisa dos vasos (KIVIMÄKI et al., 2011).

### 3.14 ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO VASCULAR

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo, onde as espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Essas espécies encontram-se envolvidas fisiologicamente na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, quando em excesso atacam os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares e das lipoproteínas, formando os ácidos graxos peroxidados que sofrem uma diminuição da cadeia lateral liberando o malonaldeído (MDA). Assim, a concentração de MDA é proporcional à quantidade de ácidos graxos poli-insaturados oxidados (BARREIROS; DAVID, 2006; RIMÓN, 2013).

As principais espécies reativas de oxigênio produzidas pelo organismo são o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. O ânion superóxido é uma das principais espécies formadas pelo metabolismo celular, sendo capaz de reagir com diversas moléculas. As reações por ele desencadeadas podem gerar os radicais hidroxila, a mais instável espécie reativa de oxigênio, podendo reagir na cadeia lateral das proteínas, onde ataca preferencialmente aminoácidos como cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de

fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares e morte celular. No sistema cardiovascular o aumento das espécies reativas de oxigênio está relacionado ao aumento de fatores pró-inflamatórios, à redução de óxido nítrico e, conseqüentemente, à disfunção vascular e desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS; DAVID, 2006).

O endotélio vascular é formado por um conjunto de células compreendida na interface entre o sangue e o músculo liso vascular. Atualmente é reconhecido que o endotélio atua como barreira permeável regulando o fluxo de nutrientes e substâncias. Pode atuar também na manutenção do equilíbrio entre trombose e fibrinólise através da liberação de substâncias como a prostaciclina, na inibição da proliferação de células do músculo liso vascular através da liberação de óxido nítrico e participa de respostas do sistema imunológico (SIMIONESCU et al., 1975; MONCADA et al., 1977; ANDREWS et al., 2001). As principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio são: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina, acetilcolina e a bradicinina, enquanto a endotelina, os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase e a angiotensina II são as principais substâncias vasoconstritoras (MATURANA ET AL., 2007).

### 3.15 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Mecanismos de ação de compostos bioativos podem ser estudados através do seu efeito em diferentes sistemas que compõem o corpo de um ser humano ou animal (muscular, circulatório, nervoso, etc). Estudos relacionados aos componentes antioxidantes têm ganhado importância devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito das espécies reativas de oxigênio no organismo, que estão relacionadas a diversas doenças, sendo uma delas a hipertensão. O excesso de espécies reativas de oxigênio no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente, como a glutatona reduzida (GSH), peptídeos compostos por cisteína e histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Também existem os antioxidantes provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), compostos fenólicos e peptídeos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

O ciclo da glutatona envolve três enzimas: a glutatona oxidase (GO), glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona redutase (GR), onde as duas primeiras são responsáveis pelo processo de oxidação da glutatona reduzida (GSH), molécula responsável por neutralizar as espécies reativas de oxigênio do organismo, convertendo-a em glutatona dissulfeto (GSSG), sua forma oxidada. A GSSG deve ser então regenerada pela GR juntamente com nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), retornando a sua forma reduzida (GSH) para atuar em um novo ciclo (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; ROVER JR. et al., 2001).

Com relação ao potencial anti-hipertensivo de compostos bioativos, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstram o efeito de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) sobre a hipertensão arterial e resumem-se em dois pontos importantes: 1) os peptídeos apresentam importância fisiológica, pois a administração oral desses produtos tem que alcançar a corrente sanguínea de forma ativa para exercer o seu efeito anti-hipertensivo, visto que a digestão gastrointestinal é uma das principais barreiras da biodisponibilidade dos peptídeos; 2) a digestão por proteases gastrointestinais pode ser usada como um processo de produção de peptídeos inibidores de ECA, com a vantagem de que os peptídeos que se formam são resistentes à digestão fisiológica depois da sua ingestão (VERMEIRSSSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE, 2002).

As proteínas e peptídeos da dieta estão sujeitos a alterações drásticas na sua estrutura durante o processo de ingestão, digestão e absorção. As proteínas ingeridas são hidrolisadas por proteases no trato gastrointestinal para produzir oligopeptídeos que podem ser biologicamente ativos. Esses oligopeptídeos serão hidrolisados a di e tripeptídeos e serão digeridos por peptidases presentes na superfície de células epiteliais, produzindo aminoácidos. Os di e tripeptídeos podem ser absorvidos através da membrana intestinal, com a ajuda de transportadores peptídicos específicos (TORRUCO-UCO et al., 2008). A partir do momento em que esses peptídeos entram na corrente sanguínea eles podem atuar no sistema-renina-angiotensina como foi descrito no item 3.12. Deste modo, a determinação da atividade da ECA em plasma e em tecidos é uma maneira de avaliar a ação de componentes anti-hipertensivos no Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (BOONLA et al., 2015).

Assim, diferentes mecanismos podem proporcionar conhecimento do potencial antioxidante e anti-hipertensivo de peptídeos: redução do estresse oxidativo, vasodilatação ocasionada por compostos que produzem óxido nítrico (NO) e a inibição da conversão da ECA (BOONLA et al., 2015; JUSTO et al., 2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

As matérias primas utilizadas foram o farelo de arroz integral, proveniente da indústria de beneficiamento de arroz Josapar e o farelo de arroz desengordurado (FAD) da indústria Irgovel, ambas localizadas em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico. A seguir estão as especificações dos principais reagentes utilizados em cada análise:

- Para a análise de digestibilidade proteica utilizou-se as enzimas pepsina (Vetec, V001221) e pancreatina (Sigma-Aldrich, P7545);
- Para a hidrólise proteica dos concentrados se utilizou as enzimas Alcalase 2.4 L (PLN05401) e Flavourzyme 1000 L (HPN00498), ambas da Novozyme, cedidas pela LNF Latino Americana;
- Para a análise da capacidade antioxidante ORAC foram utilizados 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloro (AAPH) (Sigma-Aldrich, 440914), fluoresceína (Sigma-Aldrich, F6377), Trolox (Sigma-Aldrich, S65192-119); para o Poder redutor utilizou-se ferrocianeto de potássio (Dinamica, 1167) e cloreto férrico (Synth, C2015.01.AF);
- Na avaliação da atividade inibidora da ECA se utilizou aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanil-prolina (Abz-Gly-Phe (NO<sub>2</sub>)-Pro, Bachem, 4003531.), a enzima conversora da angiotensina (EC 3.4.15.1, Sigma-Aldrich, A6778);
- Nos ensaios de reatividade vascular se utilizou a metoxamina (Sigma-Aldrich, M6524) e acetilcolina (Sigma-Aldrich, A6625);
- Para o ensaio de MDA em plasma foi utilizado ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, D113506), malonaldeído (Sigma-Aldrich, 36357);
- O ensaio de atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) além da enzima, que foi citada anteriormente, utilizou-se o substrato Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) (Sigma-Aldrich, H1635) e o-ftaldeído (Sigma-Aldrich, P0657);
- Para determinar a concentração de glutathiona reduzida em tecido hepático foram utilizados monoclorobimane (Sigma-Aldrich, 69899), glutathiona S-transferase de fígado

de cavalo (Sigma-Aldrich, G6511) e a concentração de proteínas do tecido efetuou-se com o kit colorimétrico (BioRad-DC Protein, 5000116);

- Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) provenientes de Charles River Laboratories España S. A. e do biotério da Faculdade de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid. Os ratos normotensos (Wistar-Kyoto) foram procedentes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid.

## 4.2 INFRAESTRUTURA

O desenvolvimento desse trabalho contou com a infraestrutura do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e demais laboratórios da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Além disso, foi possível dar avanço ao objetivo desse estudo através do uso das instalações do Instituto de Investigación en Ciencia de la Alimentación, do Consejo superior de Investigación Científicas (CSIC), na Universidad Autónoma de Madrid e ao Departamento de Farmacología da Facultad de Medicina da Universidad Complutense de Madrid, Espanha.

## 4.3 MÉTODOS

### 4.3.1 Preparo e composição do farelo desengordurado

O farelo de arroz integral foi inicialmente tamisado em malha 42 (0,335 mm) para a remoção de casca, quirera e outros componentes maiores. Em seguida foi submetido ao desengorduramento conforme Wang et al. (1999), com hexano na proporção 1:3 (farelo:hexano), mantendo sob agitação em *shaker* (Cientec, CT-712RNT, Brasil) à uma temperatura de 50 °C por 30 minutos. O hexano com a gordura foi removido, repondo o solvente para mais uma etapa de extração, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a retirada do hexano, o farelo desengordurado úmido foi colocado em um recipiente aberto para evaporação do resíduo de solvente à temperatura ambiente por 18 horas. Este farelo foi tamisado novamente, porém em malha 100 (0,150 mm) obtendo-se a amostra FAD-1.

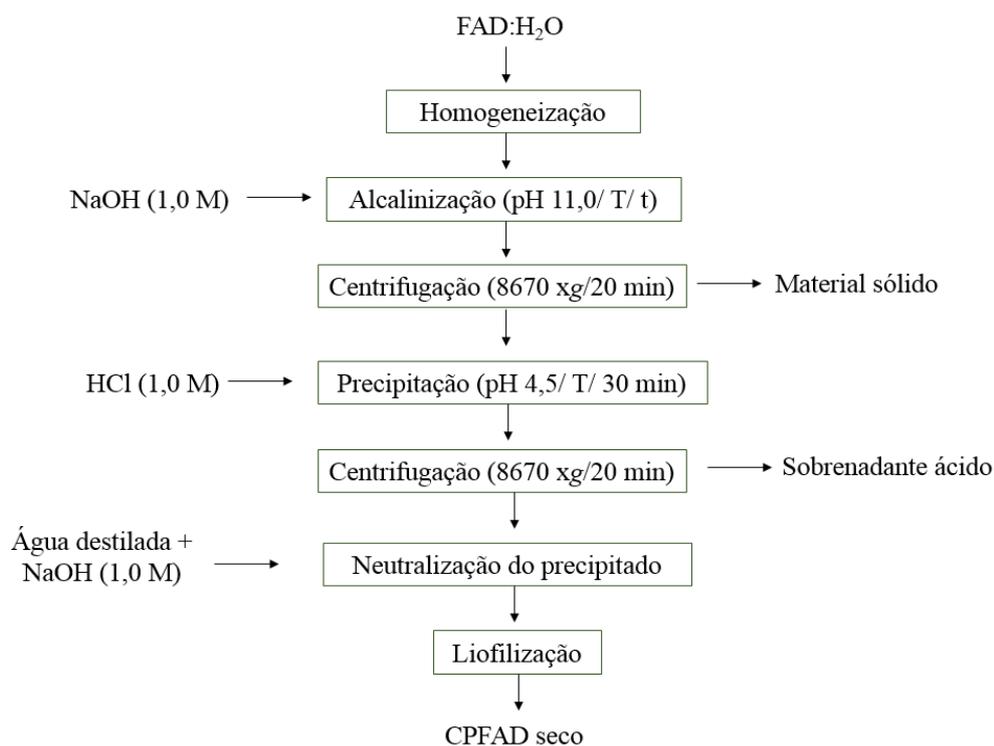
O farelo desengordurado obtido da indústria (FAD-2), em forma de pellets, foi triturado em moinho de facas (Tecnal, TE-650, Brasil) e tamisado em malha 100 h. Os farelos

desengordurado e peneirado foram caracterizados quimicamente pela composição proximal segundo a AOAC (2000) e a quantidade de carboidratos foram determinadas por diferença.

#### 4.3.2 Obtenção dos concentrados proteicos do farelo de arroz desengordurado (CPFAD)

Para a obtenção dos concentrados proteicos foi utilizado o método de variação do pH (NOLSØE; UNDELAND, 2009), como demonstrado na Figura 13, realizando a solubilização proteica dos farelos (FAD-1 e FAD-2) em pH alcalino (pH 11,0 - NaOH 1 M) e a precipitação no ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5 - HCl 1 M).

**Figura 13-** Processo geral da obtenção do concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado (CPFAD).



FAD: farelo de arroz desengordurado; CPFAD: concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado. T: temperatura de processo; t: tempo de solubilização das proteínas. Valores de T e t conforme estabelecido no planejamento.

Após a solubilização da proteína, a suspensão foi centrifugada (Hanil Science Industrial, SUPRA 22 K, Coréia) a 8670 x g por 20 minutos, à 20 °C, coletando o sobrenadante que, após o ajuste de pH para 4,5 e precipitação das proteínas, foi novamente

submetido à centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente. Finalmente o precipitado foi neutralizado com água e NaOH 1,0 M, e liofilizado (LIOTOP L108, Brasil), obtendo o CPFAD seco.

Foram realizados dois planejamentos experimentais fatoriais completos  $2^3$ , totalizando 17 ensaios utilizando os farelos FAD-1 e FAD-2 para obter os respectivos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2. A Tabela 2 apresenta os valores das variáveis utilizados nos planejamentos.

**Tabela 2-** Faixa de variação da relação FAD:H<sub>2</sub>O, temperatura e tempo na obtenção do CPFAD.

	-1.68	-1	0	+1	+1.68
FAD:H <sub>2</sub> O (g/mL)	1:5,3	1:6	1:7	1:8	1:8,7
Temperatura (T, °C)	23,2	30	40	50	56,8
Tempo (t, min.)	43,2	50	60	70	76,8

FAD: farelo de arroz desengordurado; CPFAD: concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado.

As respostas estudadas foram  $Y_1$  rendimento em massa seca de concentrado ( $R_c$ ),  $Y_2$  conteúdo de proteína ( $P_i$ ) (Kjeldahl %N x 5,95) e  $Y_3$  rendimento em proteína ( $R_{pt}$ ),

Para o cálculo dos rendimentos  $R_c$  e  $R_{pt}$  utilizou-se as Equações 1 e 2, onde  $m_{conc}$ , é a massa de concentrado seco,  $m_{FAD}$  é a massa de FAD utilizado no processo,  $P_{conc}$ , é o conteúdo de proteína do concentrado seco e  $P_{FAD}$  é o conteúdo de proteína do FAD.

$$R_c = \frac{m_{conc}}{m_{FAD}} \times 100 \quad (1)$$

$$R_{pt} = \frac{m_{conc} \times P_{conc}}{m_{FAD} \times P_{FAD}} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.3.3 Produção e caracterização dos concentrados proteicos

Foram produzidos os concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2 nas melhores condições determinadas pelo planejamento experimental em maior quantidade (300 g) e submetidos às análises de caracterização, como composição química, massa molar, digestibilidade, calorimetria, espectroscopia de infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os conteúdos de umidade, proteínas, gordura e cinzas dos concentrados foram determinados por metodologia oficial da AOAC (2000).

#### 4.3.4 Massa molar dos concentrados proteicos

Para determinar a massa molar dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2 foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) numa concentração de 14%, conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras de concentrados ( $0,4\% - p_{\text{proteína}}/V_{\text{água}}$ ) foram tratadas com 100  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol 5%. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 35 mA durante 3 h. Após ocorrida, o gel foi corado com uma solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 6,8% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue (1 mg/mL) por aproximadamente 3 h e em seguida foi descorado em uma solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 6,8% (v/v) até a revelação nítida do gel. A massa molar das bandas foi determinada por comparação com um padrão contendo Fosforilase-b 97 kDa, Albumina 66 kDa, Ovalbumina 45 kDa, Anidrase carbônica 30 kDa, Inibidor de tripsina 20,1 kDa e  $\alpha$ -Lactalbumina 14,4 kDa (Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare, UK).

#### 4.3.5 Digestibilidade dos concentrados proteicos

Para verificar a digestibilidade dos concentrados proteicos utilizou-se o método descrito por Akeson e Stahman (1964) com modificações. Para isto, utilizou-se 1 g de concentrado que foi submetido a uma hidrólise inicial com 10 mL de pepsina, diluída em solução de HCl 0,1 M, na concentração de 3 mg/mL. A hidrólise inicial foi realizada por um período de 3 horas a 37 °C. Em seguida, o meio foi neutralizado para continuar a hidrólise com 10 mL de pancreatina, diluída em tampão fosfato pH 8,0, na concentração de 4 mg/mL, por 24 horas a 37 °C. A hidrólise foi finalizada pela adição de 10 mL de TCA 30% e, para finalizar, o volume de amostra foi completado para 50 mL com TCA 5%. As amostras foram centrifugadas a 8670  $\times g$  por 10 minutos e o sobrenadante, que continha a proteína digerida, foi submetido à análise de proteína total, por Kjeldahl. Para determinar a digestibilidade (%D) se relacionou a quantidade de proteína inicial ( $P_{\text{CPFAD}}$ ), submetida à digestão, pela quantidade de proteína digerida ao final do processo ( $P_{\text{digerida}}$ ), conforme a Equação 3 Foi preparada uma amostra em branco, sem a adição da amostra, avaliando o conteúdo de proteína referente às enzimas ( $P_{\text{enzima}}$ ).

$$\%D = \frac{P_{CPFAD}}{P_{digerida} - P_{enzima}} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.3.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos concentrados proteicos

Para avaliar a estabilidade térmica das proteínas utilizou-se o calorímetro diferencial de varredura (DSC-Q20, TA Instruments, New Castle, USA), utilizando o método descrito por Zhang et al.(2012), com algumas alterações. Amostras de 3 mg de concentrado foi pesada em cápsula de alumínio, selada e aquecida a uma taxa de 10 °C / min em uma faixa de temperatura de 30 a 200 °C, usando uma cápsula vazia como referência. As temperaturas de início ( $T_0$ ), de desnaturação ( $T_d$ ), final ( $T_f$ ) e a entalpia de desnaturação ( $\Delta H$ ) foram analisadas a partir das curvas obtidas utilizando o programa do instrumento.

#### 4.3.7 Espectrometria de infravermelho (FT-IR) dos concentrados proteicos

Com o intuito de avaliar a estrutura e os compostos presentes nos concentrados utilizou-se a espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  e número de scans de 45, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , conforme Zhao et al.(2012). Para isso, foi utilizada a técnica da refletância difusa utilizando pastilhas de brometo de potássio. Os espectros foram obtidos através do programa IRsolution Ver 1,5, que acompanha o equipamento (Prestige-21 The-210045, Shimadzu, Japão).

#### 4.3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos concentrados proteicos

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em amostras do precipitado formado no ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5). Para isto, a partir da suspensão precipitada foi coletado 10  $\mu\text{L}$  e colocada sobre o *stub* de alumínio, deixando secar em estufa a 25 °C por 16 h. Para o ensaio no microscópio (Jeol, JSM - 6610LV, Japão), as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e utilizada uma aceleração de elétrons de 15 kV.

#### 4.3.9 Atividade das enzimas proteolíticas

As enzimas utilizadas para a hidrólise foram a Alcalase 2.4L e Flavourzyme 1000L. Ambas inicialmente foram analisadas quanto à sua atividade enzimática conforme o método

descrito pela (SIGMA-ALDRICH, 2011) como ensaio universal para determinar a atividade de proteases. Para isso se utilizou como proteína padrão a caseína 0,65% em tampão fosfato (50 mM pH 7,5). Foram analisadas diferentes concentrações de enzima em água ultrapura ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  v/v) e sua atuação sob o substrato padrão após a reação a 37 °C pelo período de 10 min. A hidrólise foi finalizada pela adição de 5mL de TCA 110 mM. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra sem a enzima, a qual foi adicionada após o fim da reação com TCA. As amostras foram centrifugadas e no sobrenadante foi realizado a análise colorimétrica, utilizando a solução de tirosina (0,05 a 1,1 µM) como padrão. Foi considerada como definição de 1 unidade (1 U) a quantidade necessária para hidrolisar a caseína o equivalente à 1 µmol de tirosina por 1 minuto a pH 7,5 na temperatura de 37 °C.

A atividade enzimática (U/mg proteína da enzima) foi calculada após a determinação da quantidade de proteína presente na solução de enzima adicionada na reação, utilizando a albumina (0,04 a 0,2 mg/mL) como padrão, conforme a Equação 4.

$$AE \left[ \frac{U}{mg} \right] = \frac{\left[ \frac{(C_{ph} \times V_a)}{(V_e \times t \times V)} \right]}{C_{pe}} \quad (4)$$

Onde  $C_{ph}$  é a quantidade de proteína hidrolisada em µmol tirosina  $V_a$  e  $V_e$  o volume de amostra e de enzima utilizada na reação transcorrida num período  $t$  e  $V$  o volume de amostra utilizada na reação colorimétrica e  $C_{pe}$  a concentração de proteína da enzima.

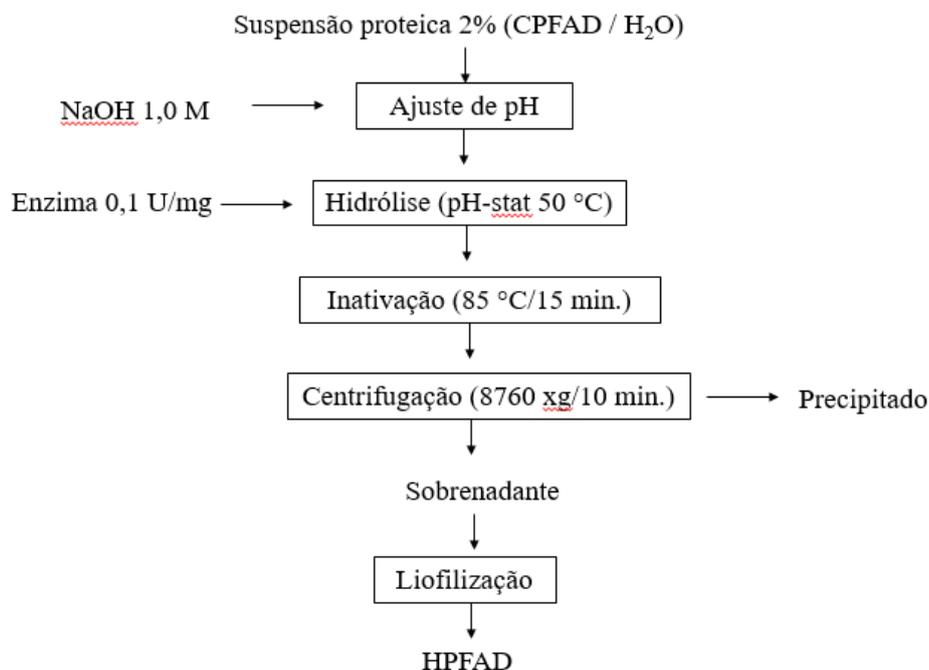
#### 4.3.10 Obtenção dos hidrolisados por hidrólise enzimática dos concentrados proteicos

As proteínas do CPFAD-1 e CPFAD-2 foram hidrolisadas enzimaticamente. Na Figura 14 está ilustrado o processo de obtenção dos hidrolisados de CPFAD, utilizando as enzimas Alcalase e Flavourzyme na concentração de 0,1 U/mg de proteína e a concentração de substrato foi de 2% ( $p_{\text{proteína}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$ ).

Inicialmente foi preparada uma suspensão proteica com o CPFAD em um reator aberto de vidro, iniciando a homogeneização mantendo a temperatura da suspensão em 50 °C. Em seguida foi adicionada a solução de NaOH 1,0 M até alcançar o pH ideal para cada enzima, ou seja, para a enzima Alcalase se utilizou o pH 8,0 e para a Flavourzyme o pH 7,0. Estando a suspensão na temperatura e pH desejada para a reação, fez-se a adição da enzima e se iniciou

a contagem do tempo para a verificação do grau de hidrólise (GH) através do método de pH-stat.

**Figura 14-** Processo de obtenção do hidrolisado de CPFAD.



CPFAD: concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado; HPFAD: hidrolisado proteico de farelo de arroz desengordurado.

A hidrólise foi realizada até o momento em que o GH alcançou o equilíbrio, ou seja, quando não havia mais sítios para a atuação da enzima e quebra da ligação peptídica. Nesse momento a suspensão foi submetida ao aquecimento a 85 °C por 10 minutos para a inativação da enzima. Por fim, o hidrolisado foi centrifugado a 8760 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado em frascos de vidro até a utilização.

#### 4.3.11 Determinação do grau de hidrólise (GH) dos hidrolisados

O GH foi determinado pelo método de pH-stat conforme Adler-Nissen (1986) citado por Zhang et al. (2010). Para isso foi montado um sistema contendo um reator de vidro encamisado acoplado a um banho termostaticado (BROOKFIELD TC/102 – EUA), um agitador de hélice (Fisatom, modelo 712, Brasil), um potenciômetro (Marconi, PA200, Brasil) e uma bureta.

Durante a homogeneização da amostra no reator, em pH e temperatura desejado, foi possível monitorar, com o auxílio do potenciômetro, a alteração do pH após a adição da enzima. Com a queda do pH, foi adicionado NaOH 0,1 M suficiente para a sua manutenção no valor desejado. Ao final de cada tempo, o volume de solução de NaOH foi verificado.

Este método relaciona o número de ligações quebradas ( $h$ ) pelo número total de ligações ( $h_{total}$ ), sendo o GH quantificado pela Equação 5.

$$GH = \frac{h}{h_{total}} = \frac{B \times N_B}{\alpha \times M_p} \times \frac{1}{h_{total}} \quad (5)$$

O número de ligações quebradas pode ser obtido relacionando o volume de NaOH adicionado ( $B$ ) e a sua normalidade ( $N_B$ ) com a média de dissociação dos grupos  $\alpha$ -NH ( $\alpha$ ) e a massa de proteína inicial ( $M_p$ ).

O grau de associação  $\alpha$  pode ser calculado seguindo a Equação 6.

$$\alpha = \frac{(10^{pH-pK})}{(1 + 10^{pH-pK})} \quad (6)$$

A constante de dissociação  $pK$  varia com a temperatura (K), sendo calculado conforme a Equação 7.

$$pK = 7,8 + \left[ \frac{298-T}{298T} \right] \times 2400 \quad (7)$$

Neste trabalho, ao início da hidrólise, foram observados os gastos de NaOH 1,0 M em períodos de 5 minutos, durante 30 minutos, e depois em períodos de 10 minutos até o momento em que cessar a hidrólise, ou seja, quando se passar 60 minutos sem adição de NaOH ao meio, pois o pH se manteve no valor desejado para cada enzima.

#### 4.3.12 Fracionamento dos peptídeos

A partir dos hidrolisados foram obtidos os peptídeos ultrafiltrados. Para isso foi preparada uma suspensão de 0,75% de hidrolisado em água e submetida ao processo de ultrafiltração em uma célula de 300 mL (Advantec MFS Inc., Japão Mod. UHP-76) acoplado a um cilindro de nitrogênio, com agitação magnética (agitador Fisatom Mod 751). Utilizou-se

uma membrana de ultrafiltração (Millipore Corporation, Billerica, U.S.A.) de celulose regenerada, 76 mm de diâmetro, na qual foi aplicada uma pressão de 60 psi. Foi utilizada uma membrana massa molar de corte de 3 kDa, obtendo assim os peptídeos com massa molar menor que 3 kDa, denominados HPFAD<3.

#### 4.3.13 Estudo das propriedades bioativas das proteínas e dos peptídeos

Na Figura 15 está ilustrado o estudo das propriedades bioativas das proteínas do farelo de arroz.

As propriedades bioativas estudadas foram antioxidante e anti-hipertensiva. Foram realizadas análises *in vitro* de atividade antioxidante como capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) e o poder redutor dos concentrados, hidrolisados e peptídeos menores de 3 kDa.

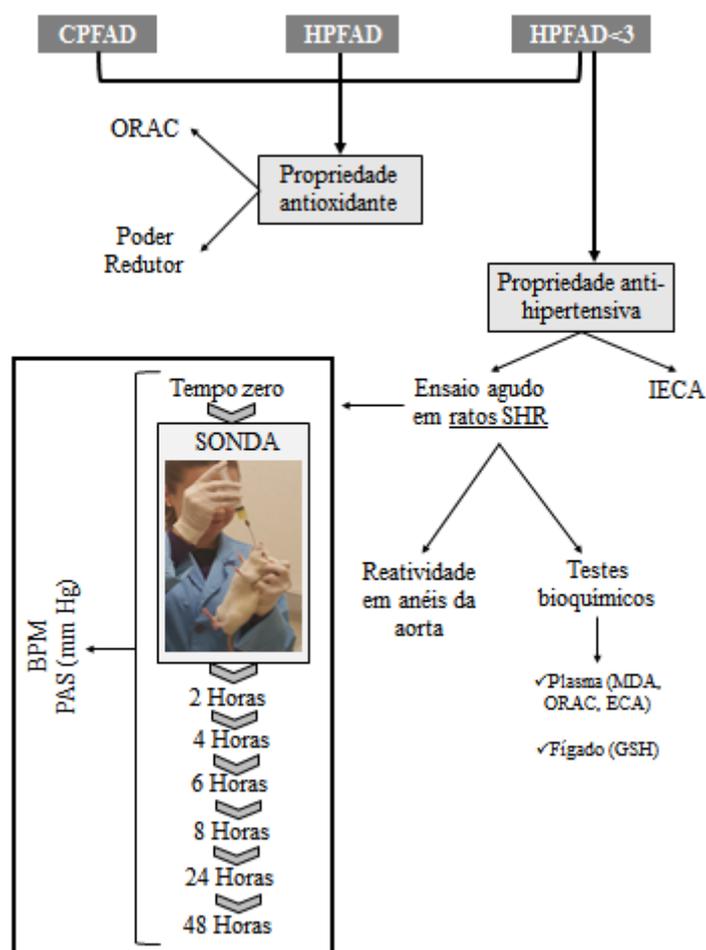
Para a avaliação da propriedade anti-hipertensiva se verificou a capacidade de inibição da enzima conversora da angiotensina (IECA) pelos peptídeos menores de 3 kDa. Após a avaliação das propriedades bioativas pelas análises químicas, passou-se para o estudo *in vivo*, avaliando o potencial dos peptídeos na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Além disso, avaliou-se a reatividade vascular *in vitro* da artéria aorta dos ratos SHR.

##### 4.3.13.1 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

A análise se baseia na decomposição térmica de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH), onde os radicais livres formados reagem para oxidar a fluoresceína. Conforme se degrada, a intensidade da emissão da fluoresceína diminui e compostos com atividade antioxidante impedem este processo. Foi utilizada o antioxidante de referência Trolox, nas concentrações de  $4 \times 10^{-4}$  a  $1,4 \times 10^{-3}$  mols para construir uma curva padrão.

O método utilizado foi o descrito por Ou; Hampsch-Woodill; Prior, (2001) e modificado por DÁVALOS et al. (2004) que consiste em adicionar 20  $\mu$ L de água ultra pura (branco) ou de amostra (em concentração testada anteriormente) e 120  $\mu$ L de fluoresceína (116,61 nM) em placas multipoços de poliestireno pretas (Nunc, Dinamarca). Na amostra controle foi adicionado apenas 80  $\mu$ L de água ultrapura e a fluoresceína. A placa com as amostras e a fluoresceína ficaram em repouso por 10 minutos no escuro e em seguida, exceto nos poços que representavam as amostras controle, foi adicionado a solução de AAPH (14 mM).

**Figura 15-** Esquema de estudo das propriedades bioativas das proteínas concentradas, hidrolisadas e ultrafiltradas do farelo de arroz.



CPFAD: concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado; HPFAD: hidrolisado proteico de farelo de arroz desengordurado; HPFAD<3: peptídeos menores de 3 kDa; ORAC: Capacidade de absorção de radicais oxigênio; SHR: ratos espontaneamente hipertensos. IECA: Inibição da enzima conversora da angiotensina; BPM: batimentos por minuto; PAS: Pressão arterial sistólica.

Todas as amostras e reagentes foram diluídos em tampão PBS 0,075 M pH 7,4. Tanto as soluções de Trolox, quanto a da fluoresceína, foram abrigados da luz sendo recobertos com papel alumínio. Após o preparo da placa, colocou-se no espectrofotômetro de fluorescência (FLUOstar LABTECH-GmbH/D-77656, Alemanha) utilizando o comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm, sendo realizada medidas da fluorescência a 40 °C, a cada minuto, durante 90 minutos. As medidas de fluorescência foram normalizadas em relação ao branco e, a partir das curvas normalizadas se calculou a área abaixo da curva (AUC) de diminuição da fluorescência através da Equação 8:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=90} f_i / f_0 \quad (8)$$

A leitura da fluorescência inicial, a zero minutos, ( $f_0$ ) foi relacionado com a fluorescência depois de “i” minutos ( $f_i$ ). Os valores de ORAC se expressaram como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox/g de proteína, usando uma curva padrão calculada para cada ensaio.

#### 4.3.13.2 Poder Redutor

A análise do poder redutor foi realizada segundo o método descrito por Oyaizu (1986). Para isso 1 mL de amostra, na concentração de 2,5 mg/mL, foi misturada com 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) e 1 mL ferrocianeto de potássio 1,0%. Essa mistura foi incubada em banho (BROOKFIELD TC/102 – EUA) a 50°C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TCA 10,0%. As amostras foram centrifugadas a 8760 xg por 5 minutos. Alíquotas de 1 mL das amostras centrifugadas foram misturadas com 1 mL de água destilada e 0,2 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 minutos, a absorbância da solução resultante foi verificada a 700nm em espectrofotômetro BIOSPECTRO SP/22 – Brasil. O aumento da absorbância da mistura da reação indica aumento da capacidade redutora.

#### 4.3.13.3 Atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (IECA)

A atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (ECA) foi determinada de acordo com o método descrito por Sentandreu; Toldrá (2006) com modificações realizadas por Quirós et al. (2009). O processo se baseia na hidrólise da aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanil-prolina (Abz-Gly-Phe(NO<sub>2</sub>)-Pro) pela ECA, tendo como produto um composto fluorescente chamado o-aminobenzoilglicina (Abz-Gly).

O substrato foi dissolvido em tampão Tris 0,15 M com NaCl 1,125 M a pH 8,3 para obter uma concentração final de 0,45 mM. Uma concentração de 0,04 U/mL de ECA foi preparada em tampão Tris 0,15 M contendo ZnCl<sub>2</sub> 0,1  $\mu\text{M}$  a pH 8,3. Para análise se utilizou uma placa multiposços de poliestireno preta (Nunc, Dinamarca). O poder inibidor da ECA foi avaliado nos peptídeos menores de 3 kDa (HPFAD<3). Para esta análise, foi considerada se considerou a presença de uma amostra controle (água+substrato+ECA), o branco da amostra (amostra de HPFAD<3+tampão+substrato) e a amostra inibidora (amostra de

HPFAD<3+substrato+ECA). Inicialmente foi adicionado 40  $\mu$ L de água ou amostra. Em seguida, no branco de amostra, foi adicionado 40  $\mu$ L de tampão Tris e nas demais 40  $\mu$ L da ECA. Para a reação enzimática, foi adicionada 160  $\mu$ L de substrato incubando por 30 minutos a 37 °C em um fluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Alemanha). A fluorescência foi medida no comprimento de onda de excitação de 350 nm e de emissão de 420 nm. A medida de fluorescência do equipamento foi controlada mediante o software Optima Control.

A porcentagem de inibição da ECA (%IECA) foi expressa conforme a Equação 9.

$$\%IECA = \frac{(F_c - F_b) - (F_M - F_{BM})}{F_c - F_b} \times 100 \quad (9)$$

Onde  $F_c$  foi a fluorescência emitida após a ação da ECA sobre o substrato fluorescente, sem a presença do componente inibidor (controle);  $F_M$  a fluorescência emitida após a ação da ECA sobre o substrato fluorescente na presença de uma substância supostamente inibidora (HPFAD<3);  $F_b$  seria a fluorescência emitida pelo substrato (branco); e  $F_{BM}$  a fluorescência emitida pelo substrato e a amostra (branco da amostra).

Os resultados finais se expressaram como  $IC_{50}$ , que se define como a concentração de proteínas de cada amostra problema que inibe 50% da atividade da enzima.

#### **4.3.14 Estudo do efeito de peptídeos de farelo de arroz na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos**

##### **4.3.14.1 Animais experimentais**

Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar-Kyoto (controle normotenso dos ratos SHR). O trabalho foi realizado em duas etapas: I (testes preliminares) - foram utilizados 8 ratos SHR de 19-25 semanas de idade e com pesos de 300-350 g, procedentes de Charles River Laboratories España S. A.; II - foram utilizados 15 ratos SHR, com pesos de 350-400 g, e 10 ratos Wistar-Kyoto com massa corporal de 300-380 g, ambos estudados nos períodos de 21 a 27 semanas de vida, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid. A investigação foi incluída no projeto aceito pelo Comité de Experimentación Animal da Universidad Complutense de Madrid (CEA-UCM) nº 40/2012, tendo validade de seis anos.

Os animais foram transportados até a Faculdade de Medicina da Universidad Complutense de Madrid, onde foram colocadas em gaiolas, com no máximo 4 animais em cada uma, sendo mantidos a uma temperatura de 23 °C, com ciclos de claro-escuro de 12 horas, ingerindo água e dieta padrão A04 Panlab *ad libitum*.

#### 4.3.14.2 Efeito agudo dos peptídeos menores de 3 kDa em ratos SHR

O tratamento agudo foi realizado com as amostras de hidrolisados ultrafiltrados obtidos de proteínas concentradas do farelo de arroz (HPFAD<3) e os controles: negativo, (água), que possibilitou a observação da variação de pressão diária dos ratos; e positivo (Captopril – 50 mg/Kg), o fármaco inibidor da ECA. A administração dos produtos se realizou através de sonda intragástrica, em dose de 1 mL, no período entre 9 e 10 horas da manhã. Antes de sondar foram coletadas as medidas da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais, sendo considerado o tempo zero. Após a sonda do produto, em períodos de 2 horas, até 8 horas, e depois em 24 horas ou 48 horas, foram realizadas medidas para verificar o comportamento da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais.

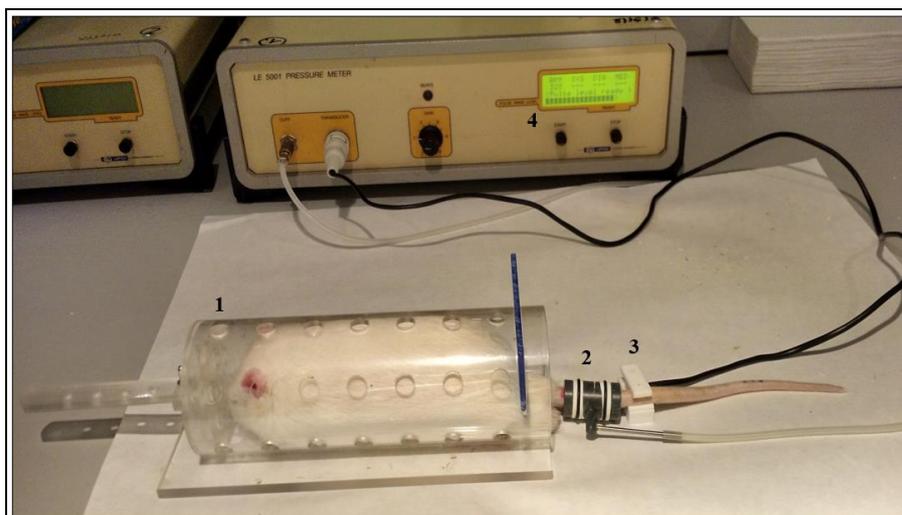
Na primeira etapa do trabalho foram administradas as amostras de peptídeos na concentração de 100 mg proteína/kg de rato (MANSO et al., 2008), possibilitando a avaliação dos peptídeos na diminuição da pressão arterial dos ratos SHR. Ao verificar a amostra mais eficaz, na segunda etapa foi testada a eficácia do produto em quantidades reduzidas (80, 40, 20, 10 e 1 mg amostra/kg de massa corporal) e o comportamento dos diferentes produtos na mesma concentração. Testes em ratos normotensos (Wistar-Kyoto) também foram realizados com a amostra mais eficaz, verificando o efeito nesse modelo animal.

#### 4.3.14.3 Procedimento de pletismografia em cauda

Pletismografia em cauda é uma maneira não invasiva de medir a pressão arterial sistólica (PAS) em ratos, método originalmente descrito por Buñag et al. (1973). As medidas foram realizadas em uma sala ambientada a 27 °C. O animal foi primeiramente levado a uma estufa a 39 ±1 °C durante 10 minutos, para elevar a sua temperatura corporal e causar a dilatação dos vasos e principalmente da artéria caudal, facilitando a obtenção da frequência de pulso ideal para iniciar as medidas em um medidor de pressão (Le50001 Letica), obtendo os valores dos batimentos cardíacos e da PAS dos ratos. Na Figura 16 está ilustrada uma foto do sistema de pletismografia.

Após o aquecimento em estufa o rato foi colocado em um contensor de acrílico (1), impedindo ao máximo os seus movimentos, deixando apenas a cauda livre para colocar o manguito (2) e o sensor de pulso (3), que permite identificar os batimentos cardíacos e a frequência. Após alcançar uma frequência cardíaca ideal, demonstrada no visor do equipamento (4), iniciava-se as medidas.

**Figura 16-** Sistema de medição da PAS de ratos SHR.



1: Contensor de ratos; 2: Medidor de pressão; 3: Manguito; 4: Sensor de pulso.

Foram coletadas no mínimo 5 medidas semelhantes e confiáveis de cada rato, obtendo a média de todas elas. A coleta de valores de PAS depende da sensibilidade do sensor para detectar o nível da onda do pulso sanguíneo. Os valores de PAS, derivam da análise da amplitude da onda de pulso, que é diminuída conforme é feita a obstrução do fluxo sanguíneo pelo manguito, e é alcançada quando se detecta novamente a onda de pulso, quando inicia o alívio da pressão e do fluxo do sangue na artéria caudal. Todos os ratos foram acostumados aos procedimentos durante o período de 2 a 3 semanas, sendo estes submetidos ao tratamento com todas as amostras, verificando o retorno da pressão basal após 24 ou 48 horas do consumo dos peptídeos. A adaptação e os testes iniciais garantiram a confiabilidade nas leituras de pressão.

Todos os experimentos realizados cumpriram a normativa científica de experimentação com animais na Espanha (Directiva Europeia 86/609/CEE e o Real Decreto 223/1988 do Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

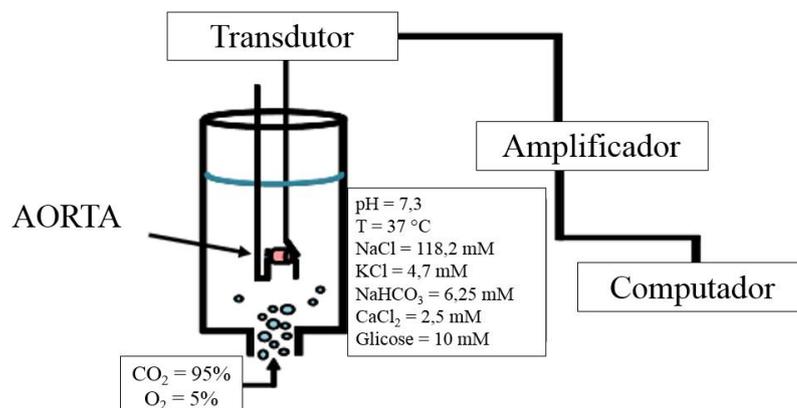
#### 4.3.15 Método de avaliação da reatividade vascular na artéria aorta

Para avaliar o efeito da presença dos peptídeos com propriedade de redução da PAS em ratos SHR sobre a reatividade vascular na artéria aorta, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e as artérias aortas torácicas foram removidas e imersas em uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C, composta por (mmol/L): NaCl 118,2; KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2 ;CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; glicose 10,0 e NaHCO<sub>3</sub> 25,0, aerada por mistura carbogênica contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Retirou-se os tecidos conectivo e adiposo das artérias sendo, em seguida, divididas em segmentos de aproximadamente 3 mm de comprimento. A obtenção do registro de tensão isométrica foi feito de acordo com o método descrito por Nielsen & Owman (1971) e o protocolo de ação nos anéis de aorta foi baseado na descrição de Sánchez et al. (2011), com algumas modificações. Cada anel de aorta foi colocado em uma cuba contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37°C e continuamente aeradas por carbogênio para alcançar um pH ótimo de 7,3-7,4. Dois pinos de metal foram colocados no lúmen dos anéis de aorta, sendo que um dos pinos era fixo e o outro estava conectado através de um fio ao transdutor de tensão isométrica (Grass FT3C, Estados Unidos), conectado a um amplificador (Ampo 16/2, España) que envia um sinal através da interface (Letica Interface LE 60-100L/H, Estados Unidos) a um software (eDAQ Chart versión 5.2, Panlab, España), permitindo obter as medidas digitais da contração e relaxamento (Figura 17).

##### 4.3.15.1 Período de estabilização e contração do anel de aorta com cloreto de potássio (KCl)

Após a montagem dos anéis de aorta, em cubas com 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, os anéis foram submetidos à tensão de repouso de 2 g, sendo feita trocas de solução e reajuste de tensão a cada 15 minutos durante os 60 minutos do período de estabilização. Após o período de estabilização as artérias foram contraídas com 250 µL de KCl (3,2 M) para comprovar sua integridade funcional por um período de 30 minutos. A contração induzida pelo KCl foi considerada como contração máxima, e os anéis de aorta com contração menor que um grama foram descartados. Depois do teste de viabilidade foram realizadas trocas contínuas da solução de Krebs-Henseleit em períodos de 15 minutos, com duração de 45 minutos.

**Figura 17-** Sistema para avaliação da reatividade em anéis de aorta.



Fonte: Rimón, 2013.

#### 4.3.15.2 Teste de integridade funcional do endotélio e provas com os peptídeos menores de 3 kDa

Após o período de estabilização, contração e nova estabilização, os anéis da aorta foram pré-contraídos com 10  $\mu$ L metoxamina (10 mM), até aproximadamente 50% da contração máxima produzida pelo KCl, e a integridade do endotélio foi determinada pela capacidade da acetilcolina (10 mM) em relaxar as artérias pré-contraídas, adicionando 10  $\mu$ L da solução nas cubas. Anéis de aorta que apresentaram relaxamento maior que 50% foram considerados segmentos com endotélio.

O efeito de vasodilatação promovida pela presença dos peptídeos foi testada após novamente um período de estabilização dos anéis (30 minutos) e contração com metoxamina. A partir da contração dos anéis um volume de 10  $\mu$ L de solução de peptídeos foi adicionada e foi verificada a propriedade vasodilatadora dos peptídeos por um período de 15 minutos.

#### 4.3.16 Testes bioquímicos em plasma sanguíneo e fígado de ratos SHR

Estudos revelam que peptídeos com capacidade antioxidante também podem apresentar propriedades anti-hipertensivas (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008; MANSO et al., 2008). Desta forma, a amostra que apresentou ambas bioatividades foi selecionada para ser novamente introduzida nos ratos SHR, com o objetivo de avaliar o seu

efeito no plasma e no tecido hepático. Após o estudo da influência dos peptídeos na pressão arterial em ratos SHR foi possível verificar a amostra mais eficiente e o período em que causa maior efeito na pressão arterial sistólica. Assim, o período que foi constatado que ocorria a maior queda de pressão dos animais, nos testes de pletismografia, foi o momento em que os animais foram sacrificados para coleta de sangue e do fígado.

Os animais foram inicialmente conduzidos a um ambiente saturado com fluoretano até ficarem inconscientes, sendo em seguida decapitados em guilhotina, coletando o sangue dentro de tubos com heparina (anticoagulante). O sangue foi centrifugado a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos para a obtenção do plasma, separando-o em alíquotas nas quantidades suficientes para as posteriores análises: capacidade antioxidante (ORAC), malonaldeído (MDA) e atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA). Seguida da coleta do sangue, o abdome dos ratos sacrificados foram abertos para efetuar a remoção do fígado, sendo guardado em tubos e congelados imediatamente, juntamente com o plasma.

#### 4.3.16.1 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) em plasma sanguíneo

O método segue o mesmo citado no item 4.3.13.1, baseado na decomposição térmica do AAPH, onde os radicais livres formados reagem para oxidar a fluoresceína, causando a diminuição da intensidade da emissão da fluorescência. Porém, nesse caso, foi verificada a capacidade antioxidante apresentada pelo plasma, tendo o resultado expresso em  $\mu\text{mol}$  de ORAC/ mL de plasma. Foi utilizada também o Trolox como antioxidante de referência, nas concentrações de  $4 \times 10^{-4}$  a  $1,4 \times 10^{-3}$  mols.

#### 4.3.16.2 Níveis de malonaldeído (MDA) no plasma sanguíneo

Os níveis de MDA no plasma foram medidos pelo ensaio de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Manso et al.(2008). Foram homogeneizados 100  $\mu\text{L}$  de plasma com 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 M em ependorf, incubando o meio a 60 °C por 30 minutos, promovendo a hidrólise proteica. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 20%, diluído em HCl 0,6 M, mantendo em gelo por 20 minutos, causando a precipitação proteica. A amostra foi centrifugada a 15000 g por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi separado e, em outro ependorf, foi misturado 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 20  $\mu\text{L}$  de TBA (120 mM em tampão Tris 260 mM, pH 7,0). A amostra foi incubada em banho a 97 °C por 30 minutos. Uma amostra em branco foi preparada com PBS comercial. O

valor de MDA no plasma foi determinado após leitura das amostras em espectrofotômetro (535 nm a 20 °C) e expresso em nmol MDA/ mL plasma.

#### 4.3.16.3 Atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) no plasma sanguíneo

A atividade da ECA foi medida através de um método fluorimétrico, conforme descrito por Manso et al. (2008). Uma amostra de 3 µl de plasma foi incubada durante 15 minutos a 37 °C com 40 µl de tampão borato, contendo uma concentração de 5 mM do substrato sintético da ECA hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu). A reação foi finalizada adicionando 190 µl de NaOH 0,35 M. O produto gerado (His-Leu), foi medido fluorimetricamente depois de 10 minutos de incubação com 100 µl de uma solução de o-ftaldialdeído 2 % em metanol. As medidas de fluorescência foram realizadas a 37 °C em leitor de placas (FLUOstar Optima, BMG Labtech GmbH, Alemanha), a um comprimento de onda de 350 nm de excitação e de 520 nm de emissão. Utilizou-se placas multipoços de poliestireno pretas. A curva padrão foi construída usando a enzima (ECA) de pulmão de coelho.

#### 4.3.16.4 Níveis de glutathiona no fígado

O conteúdo de glutathiona reduzido no fígado foi determinado pelo método descrito por Kamencic et al.(2000). Para realizar a determinação de glutathiona reduzida, as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 7,4 a 4 °C, utilizando o homogeneizador ultraturrax. Os homogeneizados foram centrifugados a 5000 xg a 4 °C durante 15 minutos, coletando 90 µl de sobrenadante em uma placa multipoços de poliestireno preta, juntamente com 10 µl de uma solução contendo glutathiona S-transferase (1U/ml) obtida do fígado de cavalo e monoclorobimane 1 mM. A placa foi incubada à temperatura ambiente protegida da luz durante 30 minutos. Neste período a glutathiona se une ao monoclorobimane, gerando um complexo fluorescente. Esta reação está catalizada pela glutathiona S-transferase. Após a reação, a concentração do complexo, ou seja de glutathiona reduzida, foi quantificado mediante um fluorímetro (FLUOstar OPTIMA, Espanha), a um comprimento de onda de excitação de 390 nm e de emissão de 510 nm. Para determinar o conteúdo de proteínas nas amostras de fígado, utilizou-se o Kit colorimétrico Bio-Rad DC Protein Assay. A concentração de glutathiona reduzida no fígado foi expressa como µmol de glutathiona reduzida/g de proteína.

#### 4.3.17 Análise estatística

Para proceder a análise dos planejamentos, realizados para a obtenção dos concentrados, utilizou-se as ferramentas disponíveis do Programa Statistica 5.0, assim como para a avaliação da diferença entre as médias  $\pm$  desvio padrão, de três determinações, da composição proximal dos farelos e concentrados e da digestibilidade dos concentrados, atividades antioxidantes e anti-hipertensiva *in vitro*, utilizando para a análise de variância de duas amostras o Teste t-Student e, quando se apresentava a partir de três amostras, realizou-se o Teste de tuckey, com um nível de confiança de 95%.

Os resultados de pressão foram expressos como média e erro padrão dos experimentos e foram analisados através da análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), usando o software GraphPad Prism 5. Além disso, os dados de mecanismo de ação dos peptídeos foram verificados através da ANOVA de uma via (One-way). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste Bonferroni, sendo considerado as diferenças entre as médias como significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS FARELOS DESENGORDURADOS

Na Tabela 3 apresenta-se os valores obtidos da análise de composição proximal dos farelos de arroz desengordurados.

**Tabela 3-** Composição proximal química (b.s.) dos farelos FAD-1 e FAD-2.

Componente	FAD-1	FAD-2
Proteína	16,7 <sup>b</sup> ±0,5	17,9 <sup>a</sup> ±0,1
Cinzas	13,7 <sup>b</sup> ±0,1	16,5 <sup>a</sup> ±0,1
Lipídeos	5,5 <sup>b</sup> ±0,2	7,7 <sup>a</sup> ±0,7
Fibras	4,2 <sup>b</sup> ±0,7	7,4 <sup>a</sup> ±0,2
Carboidratos*	59,9	50,5

FAD-1: farelo de arroz desengordurado em laboratório; FAD-2: farelo de arroz desengordurado na indústria.

\*Obtidos por diferença. Média ±desvio padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os farelos ( $p < 0,05$ ).

A umidade dos farelos FAD-1 e FAD-2 foram 14,6±0,3% e 12,0±0,1%, respectivamente, mostrando diferença significativa entre elas, assim como todos os outros componentes. Segundo Pestana; Mendonça; Zambiasi (2008) as características químicas do farelo de arroz dependem de fatores como, cultivo, tratamento do grão antes do beneficiamento, sistema de beneficiamento empregado e grau de polimento ao qual o grão foi submetido. Devido a isto, os valores expressos na literatura para composição do farelo de arroz apresentam muita variação.

Outro fator importante para explicar as diferenças entre os componentes seriam os processos aos quais os farelos foram submetidos na indústria e no laboratório. Na indústria (FAD-2) foi realizado o processo de peletização (80 °C e pressão de vapor direto de 0,3 kg/cm<sup>2</sup>) e após o processo de extração com hexano a 50 °C foi feita a desolventização (90 °C, pressão de vapor direto de 1,5 kg/cm<sup>2</sup> por 70 minutos). O farelo peletizado foi então triturado e peneirado (0,150 mm), fazendo com que fragmentos de casca, que poderiam estar presentes no farelo integral, podem ter tido o seu tamanho reduzido ao ponto de passar pela malha da peneira e, com isso, acarretar em um maior conteúdo de fibras e cinzas neste farelo. No entanto, o FAD-1, obtido em laboratório, antes de ser desengordurado, foi peneirado

removendo uma grande quantidade de casca e, conseqüentemente, apresentou-se com um conteúdo menor de cinzas.

Com relação ao conteúdo de lipídeos, o processo industrial, em larga escala, favorece que uma parcela de lipídeos se mantenha ainda no farelo peletizado, diferente ao processo que foi realizado no laboratório, com o farelo integral em pó, que facilitou a extração do óleo pelo solvente, obtendo-se assim uma porcentagem menor de lipídeos no FAD-1, mesmo que a extração, tanto na indústria quanto no laboratório, tenha sido realizada com hexano e na temperatura de 50 °C.

## 5.2 RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de rendimento em massa, conteúdo de proteínas e rendimento em proteína dos concentrados obtidos por diferentes condições, conforme o planejamento.

Os rendimentos obtidos para o concentrado CPFAD-1 foram muito maiores que o CPFAD-2, porém os valores de proteína foram maiores no CPFAD-2, apresentando a média 8,4% maior. Desta forma, obteve-se um maior rendimento de proteína no concentrado do FAD-1, constatando que o maior valor de rendimento em massa do CPFAD-1 foi em função da maior quantidade de compostos não proteicos.

Observou-se que o rendimento proteico ( $R_{pt}$ ) está diretamente ligado ao rendimento em massa, comportamento verificado em todos os ensaios para os dois planejamentos. Como exemplo, no Ensaio 12 do FAD-2, o rendimento em proteína se destacou mesmo sendo o concentrado com menor porcentagem de proteína, sendo aproximadamente 13% menor que o Ensaio 2, que apresentou maior quantidade de proteína, porém um rendimento em massa menor. Boonla et al. (2015) trabalharam com a proteína proveniente de farelo de arroz desengordurado e obtiveram um rendimento de 8,8% e uma porcentagem de proteína de 46,6%, valores inferiores aos obtidos neste trabalho.

Os efeitos das variáveis relação FAD:H<sub>2</sub>O, temperatura e tempo de processo no rendimento em massa de concentrado, na porcentagem de proteína e no rendimento em proteína estão apresentados na Tabela 5.

No CPFAD-1 verificou-se que para as respostas rendimento em massa e em proteína somente a variável T (L) e (Q) foi significativa. Para o conteúdo proteico, além da T, a relação FAD:H<sub>2</sub>O mostraram um efeito negativo, e a interação FAD:H<sub>2</sub>O x t foi positiva.

**Tabela 4-** Valores de rendimento, conteúdo proteico e rendimento em proteína dos concentrados proteicos ( $\alpha=1,68$ ).

Ensaio	Variável codificada			CPFAD-1			CPFAD-2		
	FAD:H <sub>2</sub> O	T	t	R <sub>c</sub> (%)	P <sub>t</sub> (%)	R <sub>pt</sub> (%)	R <sub>c</sub> (%)	P <sub>t</sub> (%)	R <sub>pt</sub> (%)
1	1:6	30	50	12,2	59,1	51,1	2,5	69,4	11,0
2	1:8	30	50	13,2	58,0	54,3	3,2	70,4	14,3
3	1:6	50	50	14,4	58,5	59,7	2,8	61,5	10,9
4	1:8	50	50	14,6	58,7	60,8	3,9	64,4	15,9
5	1:6	30	70	13,4	57,5	54,6	2,3	69,0	9,9
6	1:8	30	70	13,8	59,6	58,3	2,0	69,8	8,9
7	1:6	50	70	14,8	53,7	56,4	4,1	64,0	16,6
8	1:8	50	70	15,2	58,5	63,1	3,3	67,0	14,0
9	1:5,3	40	60	15,0	54,5	58,0	2,4	63,9	9,7
10	1:8,7	40	60	14,4	55,6	56,8	2,8	67,6	12,0
11	1:7	23,2	60	11,2	57,4	45,8	1,7	68,2	7,3
12	1:7	56,8	60	14,8	55,4	58,1	8,5	57,1	30,7
13	1:7	40	43,2	14,4	57,2	58,4	4,7	68,5	20,4
14	1:7	40	76,8	13,6	60,7	58,5	4,4	64,7	18,0
15	1:7	40	60	14,4	59,3	60,3	4,9	67,5	20,9
16	1:7	40	60	15,0	59,9	63,7	4,4	67,2	18,7
17	1:7	40	60	14,2	60,4	60,8	4,4	66,8	18,6

CPFAD-1: concentrado proteico de FAD-1; CPFAD-2: concentrado proteico de FAD-2; FAD:H<sub>2</sub>O: relação farelo: água (g:mL); T: Temperatura (°C); t: tempo de solubilização (min); R<sub>c</sub>: rendimento em massa de concentrado seco; P<sub>t</sub>: porcentagem de proteína do concentrado seco; R<sub>pt</sub>: rendimento em proteína do concentrado seco.

No CPFAD-2 foi possível verificar que as variáveis aplicadas influenciaram nas respostas de rendimentos e proteína. Para os rendimentos (R<sub>c</sub> e R<sub>pt</sub>) os parâmetros relação FAD:H<sub>2</sub>O (Q) e T (L) influenciaram significativamente, sendo que, quanto menor a proporção de água e maior a temperatura, maior foi o rendimento em massa de concentrado e em proteína. A variável temperatura apresentou influência negativa para os rendimentos em massa e em proteína em temperaturas superiores a 56,8°C.

Na porcentagem de proteína, a relação FAD:H<sub>2</sub>O (L), as T (L) e (Q) e a interação T x t, foram os parâmetros que apresentaram influência significativa. Neste caso, quanto maior a relação FAD:H<sub>2</sub>O e menor a T, maior a porcentagem de proteína.

**Tabela 5-** Efeitos da relação farelo:água, (FAD:H<sub>2</sub>O) temperatura (T) e tempo (t) no rendimento em massa (R<sub>c</sub>), porcentagem de proteína (P<sub>t</sub>) e rendimento em proteína (R<sub>pt</sub>) do CPFAD-1 e CPFAD-2.

		R <sub>c</sub>		P <sub>t</sub>		R <sub>pt</sub>	
		Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
CPFAD-1	Média	14,52	0	59,77	0	61,49	0
	FAD:H <sub>2</sub> O (L)	0,14	0,664	1,15	0,061	1,86	0,202
	FAD:H <sub>2</sub> O (Q)	0,15	0,667	-2,81	0,013	-2,21	0,181
	T (L)	1,82	0,001	-1,19	0,057	6,21	0,025
	T (Q)	-1,04	0,021	-1,85	0,03	-6,07	0,031
	t (L)	0,21	0,526	0,12	0,708	0,98	0,429
	t (Q)	-0,33	0,37	-0,05	0,892	-1,47	0,312
	FAD:H <sub>2</sub> O x T	-0,2	0,647	1	0,124	0,23	0,878
	FAD:H <sub>2</sub> O x t	-0,1	0,818	1,95	0,038	1,53	0,361
	T x t	-0,2	0,647	-1,25	0,085	-2,13	0,243
CPFAD-2	Média	4,64	0,001	67,03	0	19,63	0,001
	FAD:H <sub>2</sub> O (L)	0,2	0,327	2,04	0,008	1,26	0,216
	FAD:H <sub>2</sub> O (Q)	-1,86	0,008	-0,08	0,744	-7,61	0,01
	T (L)	2,28	0,004	-5,91	0,001	7,71	0,008
	T (Q)	-0,09	0,665	-2,28	0,008	-1,83	0,141
	t (L)	-0,18	0,376	-0,33	0,22	-0,99	0,295
	t (Q)	-0,48	0,109	0,52	0,129	-1,69	0,161
	FAD:H <sub>2</sub> O x T	-0,03	0,913	1,03	0,053	0,03	0,98
	FAD:H <sub>2</sub> O x t	-0,73	0,07	-0,03	0,928	-2,98	0,083
	T x t	0,53	0,123	1,53	0,025	2,58	0,107

CPFAD-1: concentrado proteico de FAD-1; CPFAD-2: concentrado proteico de FAD-2; FAD:H<sub>2</sub>O: g/mL; T: (°C); t: (min); Variável significativa com p<0,05.

Assim, realizou-se a análise de variância das variáveis que apresentaram significância na obtenção dos concentrados proteicos, com um nível de confiança de 95%, apresentado na Tabela 6.

Para o CPFAD-1 o valor do F<sub>cal</sub> foi próximo do F<sub>tab</sub> e o coeficiente de correlação apresentou-se baixo. De acordo com KALIL; MAUGERI; RODRIGUES (2000), um modelo tem significado estatístico quando o valor de F calculado é pelo menos de 3 a 5 vezes maior do que o tabelado, considerando assim que o modelo não apresentou significância e predição foi significativo e não preditivo, pelo coeficiente de correlação.

**Tabela 6-** Análise de variância do CPFAD-1 e CPFAD-2 a um nível de confiança de 95%.

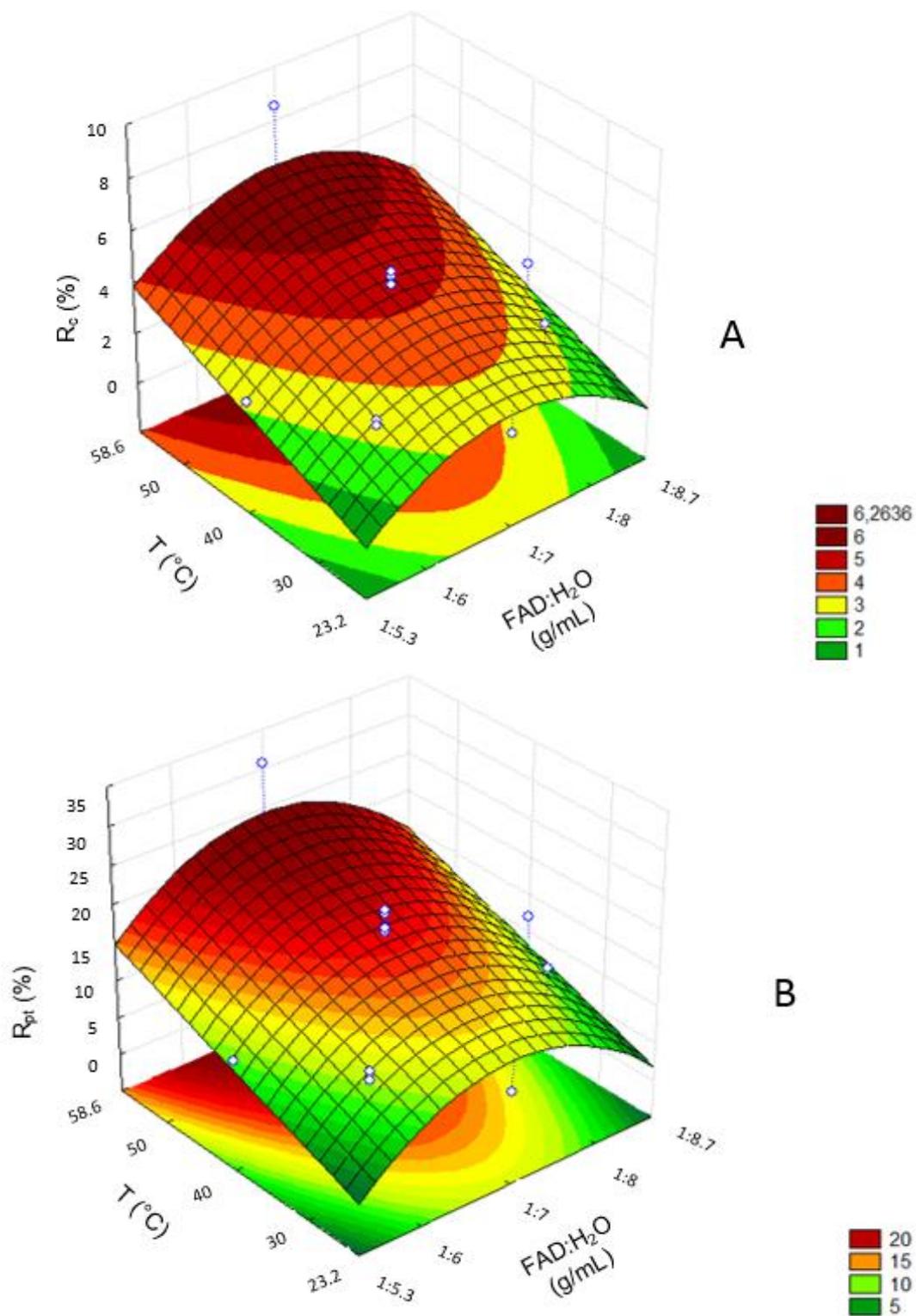
Resposta		Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
CPFAD-1	P <sub>t</sub>	Regressão	3	36	12,14	5,1	3,81
		Resíduo	13	30,95	2,38		
		Total	16	67,38			
	R <sub>c</sub>	Regressão	2	27	13,68	13,92	3,74
		Resíduo	14	13,76	0,98		
		Total	12	13,59			
CPFAD-2	P <sub>t</sub>	Regressão	4	156	39,12	17,06	3,26
		Resíduo	12	27,5	2,29		
		Total	10	27,26			
	R <sub>pt</sub>	Regressão	2	353	176,59	13,03	3,74
		Resíduo	14	189,72	13,55		
		Total	12	186,34			

CPFAD-1: concentrado proteico de FAD-1; CPFAD-2: concentrado proteico de FAD-2; R<sub>c</sub>: rendimento em massa de concentrado seco; P<sub>t</sub>: porcentagem de proteína do concentrado seco; R<sub>pt</sub>: rendimento em proteína do concentrado seco. Coeficiente de correlação: CPFAD-1 (P<sub>t</sub> = 0,7353); CPFAD-2 (R<sub>c</sub> = 0,8157; P<sub>t</sub> = 0,9222; R<sub>pt</sub> = 0,8095)

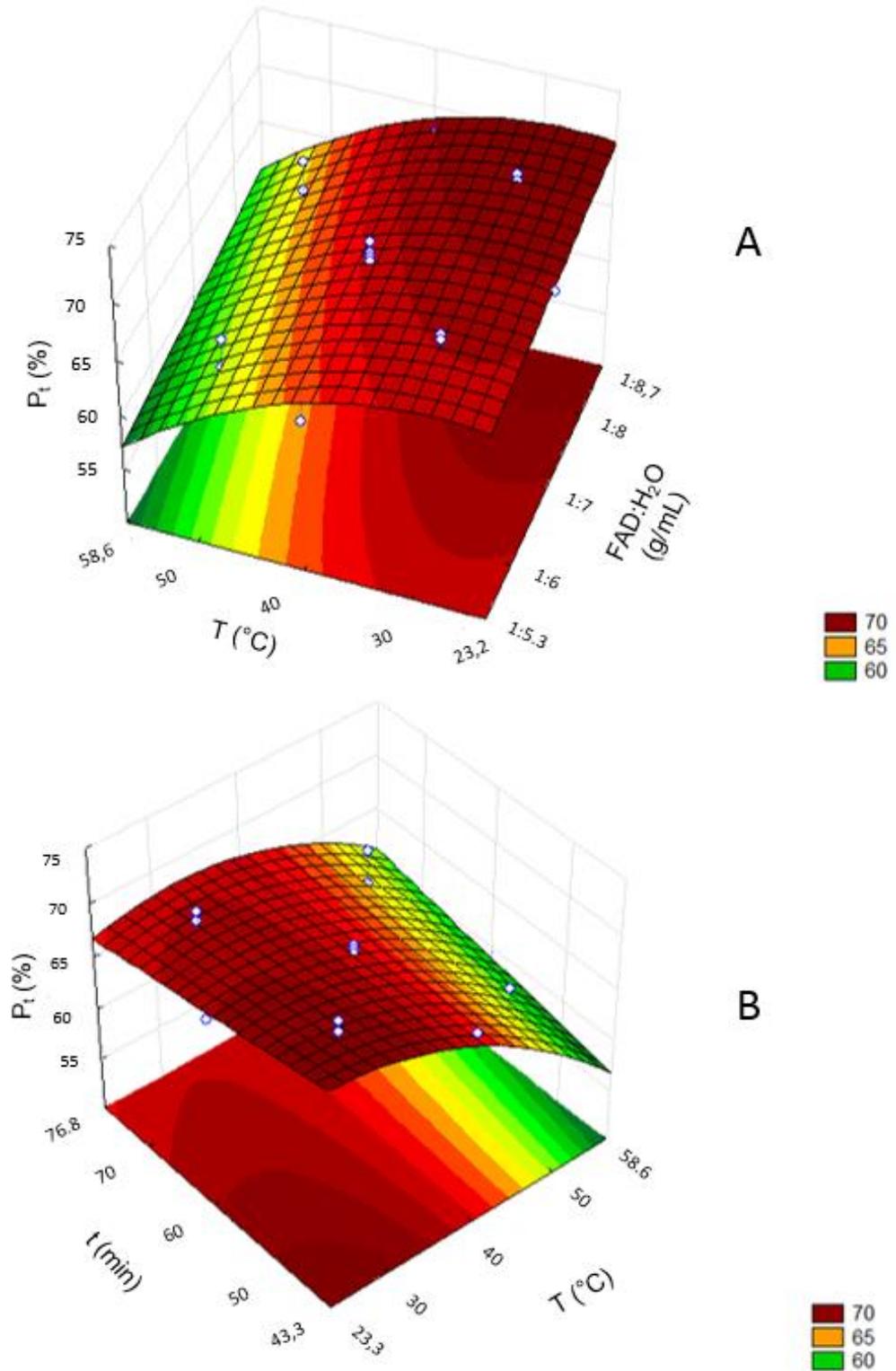
Para o CPFAD-2 foi observado que na análise dos rendimentos a relação F<sub>cal</sub> e F<sub>tab</sub> foram semelhantes e três vezes maior, com um coeficiente de correlação acima de 80%. Para a porcentagem de proteína, a relação F<sub>cal</sub> e F<sub>tab</sub> foi cinco vezes maior, com um coeficiente de 92%. Neste caso, considerou-se o modelo significativo e preditivo. A partir dos modelos matemáticos obtidos (E.10, E.11, E.12) para os rendimentos em massa (R<sub>c</sub>), para o conteúdo proteico (P<sub>t</sub>) e rendimento em proteína (R<sub>pt</sub>), foi possível construir as superfícies de resposta (Figura 18 e 19).

Como já foi citado anteriormente, o comportamento dos rendimentos dos concentrados obtidos do FAD-2 foi semelhante com relação às condições de processo e a resposta de rendimento em proteína foi dependente do rendimento em massa. Os melhores rendimentos foram obtidos em uma condição central de relação FAD:H<sub>2</sub>O e tempo e em valores maiores de temperatura. Isso pode ser possível em função de uma maior solubilização dos componentes presentes no farelo. Em função disso, também foi constatado que, para se obter um concentrado mais puro, com maior conteúdo de proteína, seria necessário utilizar baixas temperaturas durante o processo.

**Figura 18-** Superfícies de resposta que relacionam [A] os rendimentos em massa de concentrado ( $R_c$ ) e [B] rendimento em proteína ( $R_{pt}$ ) para o CPFAD-2 com os parâmetros FAD:H<sub>2</sub>O e temperatura (T).



**Figura 19-** Superfícies de resposta que relacionam a porcentagem de proteína ( $P_t$ ) do CPFAD-2 com [A] relação FAD:H<sub>2</sub>O e temperatura (T) e [B] temperatura (T) e tempo (t).



$$R_c = 4,64 - 1,858[FAD:H_2O]^2 + 2,27[T] \quad (10)$$

$$P_t = 67,03 + 2,04[FAD:H_2O] - 5,91[FAD:H_2O]^2 - 2,12[T]^2 + 1,52[Txt] \quad (11)$$

$$R_{pt} = 19,63[FAD:H_2O]^2 + 7,71[T] \quad (12)$$

A escolha das melhores condições para se obter o concentrado proteico foi relacionada à maior quantidade de proteína (CPFAD-1) e o rendimento proteico (CPFAD-2). Assim, para o CPFAD-1 os ensaios de 15 ao 17 (ponto central) foram os que apresentaram maiores porcentagens de proteína (média de 59,9%) e, para o CPFAD-2, o Ensaio 12 foi a condição em que se obteve o maior rendimento em proteína (30,7%). Com isso, a temperatura foi a única variável diferenciada no processo de obtenção dos concentrados, sendo utilizada uma temperatura intermediária para o CPFAD-1 (40 °C) e mais alta em CPFAD-2 (56,8 °C), pois as condições de relação FAD:H<sub>2</sub>O e tempo se mantiveram no ponto central.

O seguimento do trabalho foi relacionado à caracterização química, térmica, estrutural e morfológica destas duas amostras de concentrado, tendo em vista que as proteínas do CPFAD-1 estariam mais intactas, comparadas com as proteínas do CPFAD-2, que sofreram modificações na sua estrutura após os processos industriais realizados na matéria prima.

### 5.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

Para as análises de caracterização, foram realizadas produções em maior escala no laboratório, de modo a conseguir uma quantidade maior de concentrado.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de composição dos concentrados proteicos, onde a umidade do CPFAD-1 foi de 3,9±0,1% e do CPFAD-2 foi 5,4±0,1%.

Os conteúdos de proteínas, em base úmida, foram de 61,1% e 58,8%, sendo semelhante aos obtidos no planejamento com o CPFAD-1 e CPFAD-2, respectivamente. Isso mostra que o aumento de escala não alterou o processo de obtenção das proteínas do farelo desengordurado. Comparando com o FAD, pode-se observar que o concentrado apresentou um conteúdo alto de proteínas, havendo a diminuição de outros componentes como cinzas e carboidratos, além de ter eliminado as fibras na primeira etapa de centrifugação. Parte das cinzas presentes nos concentrados pode ser em função da presença de sal que se forma pela adição do hidróxido de sódio e ácido clorídrico durante os processos de solubilização e precipitação das proteínas (PASTRE et al., 2012).

**Tabela 7-** Composição proximal (b.s\*) dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2

Componentes	CPFAD-1	CPFAD-2
Umidade	3,9 <sup>b</sup> ±0,1	5,4 <sup>a</sup> ±0,1
Proteínas*	63,6 <sup>a</sup> ±1,4	62,1 <sup>a</sup> ±0,4
Cinzas*	4,3 <sup>b</sup> ±0,1	5,4 <sup>a</sup> ±0,1
Lipídeos*	20,2 <sup>a</sup> ±0,3	15,1 <sup>b</sup> ±0,3
Carboidratos**	11,9	17,4

\*\*Carboidratos calculados por diferença. Média ±desvio padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os farelos (p<0,05).

Bandyopadhyay; Misra; Ghosh (2008) produziram concentrados de farelo de arroz indiano, apresentando valores de proteínas superiores ao deste trabalho, porém a matéria prima analisada nesse caso, apresentava um conteúdo maior de proteína. Assim, a partir do farelo com 20,8% de proteína obteve-se um concentrado com 86,2% de proteína.

Observou-se que o conteúdo de lipídeos presentes nos concentrados foi maior comparado ao farelo. Esse fato também foi verificado por Boonla et al. (2015) ao trabalhar com farelo de arroz desengordurado e, no final do processo de obtenção da proteína, obteve um concentrado com 16,32% de lipídeos. Pode-se considerar este fato devido ao uso de temperaturas mais elevadas de processo, acarretando o arraste dessa porção lipídica no momento da precipitação da proteína. A presença dos lipídeos no concentrado poderia ser diminuída com o uso da centrifugação à baixas temperaturas, promovendo a separação destes na fase superior do sobrenadante.

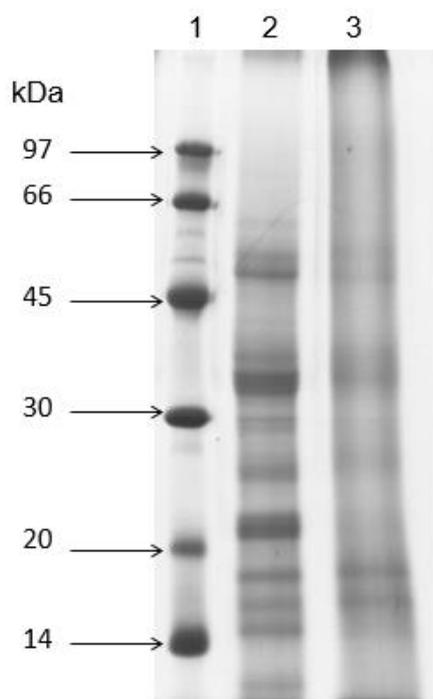
#### 5.4 MASSA MOLAR E DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

Na Figura 20 estão ilustradas as bandas correspondentes às proteínas dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2, comparando as massas molares através das bandas apresentadas por um padrão de proteínas conhecidas.

Pode-se observar que as massas molares de quase todas as proteínas concentradas se apresentaram inferiores a 50 kDa. O CPFAD-1 apresentou bandas mais visíveis comparadas com o CPFAD-2. Esse comportamento também foi observado em concentrados proteicos de endosperma de arroz nativo e tratado termicamente analisados por Zhao et al. (2012), onde o endosperma tratado apresentou menos visibilidade de bandas comparadas com o concentrado do endosperma nativo. Os autores atribuem essa diferença entre as bandas ao tratamento que

foi utilizado, como pressões e temperaturas elevadas. Outro motivo poderia estar relacionado com a quantidade de proteína que se apresentava em solução, sendo que poderia estar em concentração menor no CPFAD-2.

**Figura 20-** Perfil eletroforético das proteínas dos concentrados proteicos de farelo de arroz.



Marcador padrão de proteínas conhecidas (1); concentrado proteico de FAD-1 (2); concentrado proteico de FAD-2 (3).

Ellepola; Choi; Ma (2005) citaram que o polipeptídeo  $\alpha$ -globulina, presente no arroz, apresenta a massa molecular de 26 kDa, sendo que as bandas apresentadas pelos concentrados, que estão presentes entre 20 e 30 kDa do padrão conhecido, podem ser pela presença deste polipeptídeo, não sendo muito visível no CPFAD-2.

## 5.5 DIGESTIBILIDADE DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

A digestibilidade do CPFAD-1 foi de  $93,0 \pm 0,2\%$ , diferindo significativamente do CPFAD-2, que foi de  $98,0 \pm 0,4\%$ . A digestibilidade do farelo de arroz está na faixa dos 73%, no entanto, quando se concentram as proteínas pode-se alcançar valores acima de 90% (SAUNDERS, 1990). A separação das proteínas dos demais componentes do farelo facilita a ação das enzimas digestivas, aumentando a sua digestibilidade. Foi observado também que o

fato da quantidade de proteínas digeridas do CPFAD-2 ter sido maior comparadas com o CPFAD-1, pode ter sido em função do FAD-2 apresentar proteínas que foram submetidas ao processo industrial com altas temperaturas e pressão, podendo causar a sua desnaturação, sendo mais facilmente digeríveis. Naves et al.(2010) também obtiveram um aumento de 27% na digestibilidade de sementes de abóbora com tratamento térmico.

## 5.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Para verificar a estabilidade térmica dos concentrados foi realizada a análise de DSC, cujos valores se apresentam na Tabela 8.

Tabela 8- Propriedades térmicas do CPFAD-1 e CPFAD-2.

Parâmetros	CPFAD-1	CPFAD-2
$T_i$ (°C)	137,94	134,1
$T_p$ (°C)	144,21	140,20
$T_e$ (°C)	150,85	152,57
$\Delta H$ (J/g)	39,26	49,25

$T_i$  : Temperatura inicial;  $T_p$  : Temperatura de pico;  $T_f$ : temperatura final de desnaturação;  $\Delta H$ : entalpia de desnaturação.

As temperaturas inicial, de pico e final foram próximas entre os concentrados, notando-se uma maior diferença na entalpia de desnaturação, ou seja, a estabilidade térmica do CPFAD-1 foi menor que a do CPFAD-2. Isto pode ser devido à presença de maior quantidade de proteínas desnaturadas no CPFAD-2, em função do uso de pressão e temperaturas altas no processo de peletização do farelo integral, que após a extração do óleo, gerou o FAD-2 utilizado para a obtenção do concentrado.

Zhao et al. (2012) também encontraram uma estabilidade maior nas proteínas de endosperma de arroz tratadas com pressão e temperatura, influenciando em uma possível agregação e compactação das proteínas. A importância de conhecer o comportamento das proteínas diante da variação de temperatura está relacionada à avaliação da sua estabilidade térmica quando forem submetidas à determinadas temperaturas durante a elaboração de um alimento, por exemplo, o qual se deseja que não ocorra alterações drásticas em sua estrutura, como a desnaturação.

## 5.7 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (FTIR) DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

Os espectros de infravermelho dos concentrados estão presentes na Figura 20. A banda Amida I, entre  $1600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , está associada principalmente com a vibração da tensão do grupo  $\text{C}=\text{O}$  e está diretamente relacionada com a conformação do esqueleto polipeptídico e o padrão de ligações de hidrogênio.

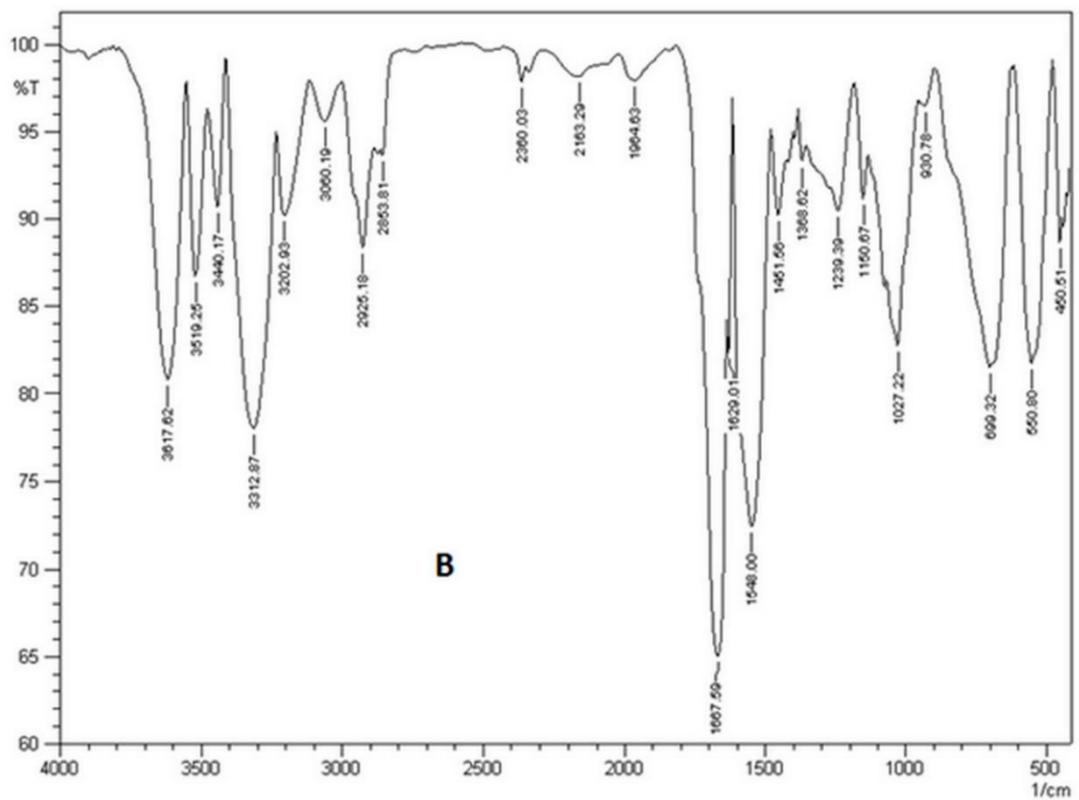
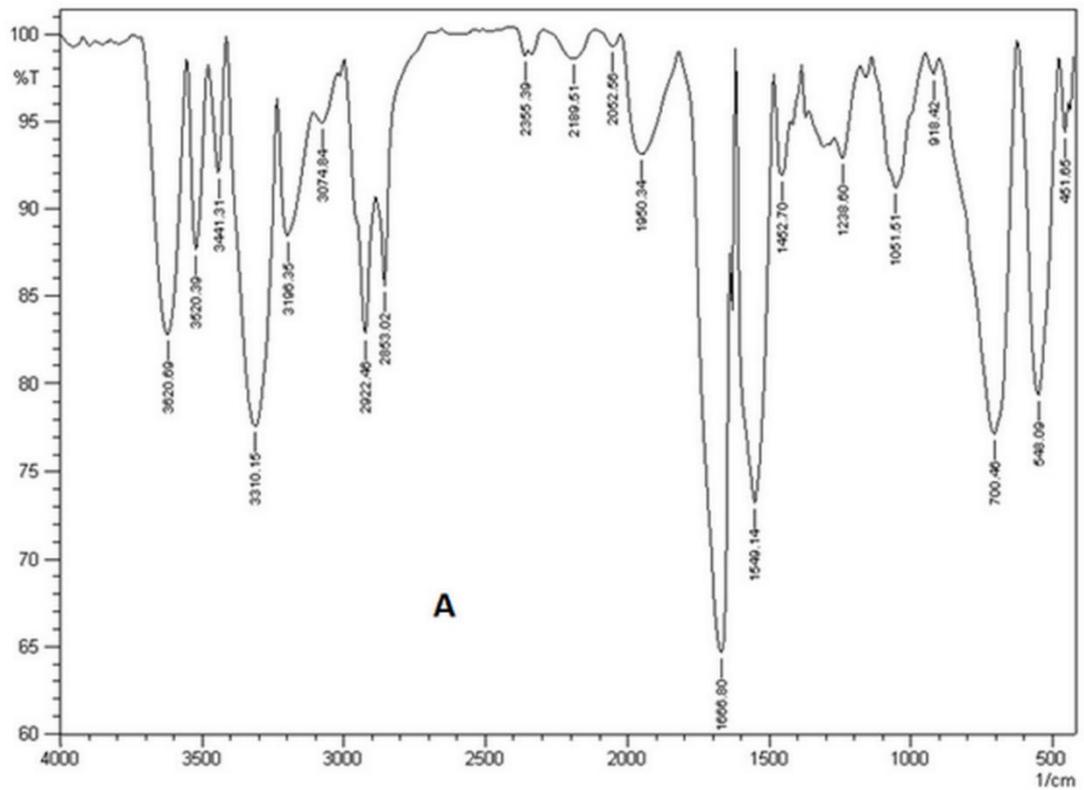
Os espectros de infravermelho dos concentrados foram semelhantes e mostraram que, para ambas amostras, o maior pico ficou justamente entre  $1600$ - $1700\text{ cm}^{-1}$ , característicos da estrutura secundária da proteína. Conforme foi apresentado por Ellepola et al (2005), os espectros referentes às bandas obtidas pelas frequências de  $1666,80\text{ cm}^{-1}$  (CPFAD-1) e  $1667,59\text{ cm}^{-1}$  (CPFAD-2) seriam representantes da conformação  $\beta$ -folha. Essa estrutura se forma a partir da inversão de  $180^\circ$  da cadeia polipeptídica envolvida na formação desta estrutura. É composta por um segmento de 4 resíduos de aminoácidos, sendo comum a presença de asparagina, cisteína, glicina, tirosina e prolina, que se dobram entre si e são estabilizadas por pontes de hidrogênio (FENNEMA; DEMODORAN; PARKING, 2010). Além da banda de amida I, a banda amida II, que seria referente à ligação peptídica, está representada pelas frequências de  $1549,14\text{ cm}^{-1}$  (CPFAD-1) e  $1548,00\text{ cm}^{-1}$  (CPFAD-2).

Foi possível verificar a presença da banda  $3310,15\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser relacionada a presença do amido proveniente da complexação com a proteína no momento da precipitação. Os carboidratos como as gomas, amido e celulose consistem em polissacarídeos contendo uma grande quantidade de grupos OH. Os polissacarídeos apresentam bandas largas e intensas próximo de  $3300\text{ cm}^{-1}$  pelo estiramento da ligação O-H e, próximo de  $1080\text{ cm}^{-1}$  pelo estiramento da ligação C-O. Bandas entre  $3000$ - $3400\text{ cm}^{-1}$  são referente à presença hidroxilas correspondente a polifenóis e álcoois, sendo que, na região de  $3600\text{ cm}^{-1}$  é característico pela presença de hidroxilas livres (BARBOSA, 2007).

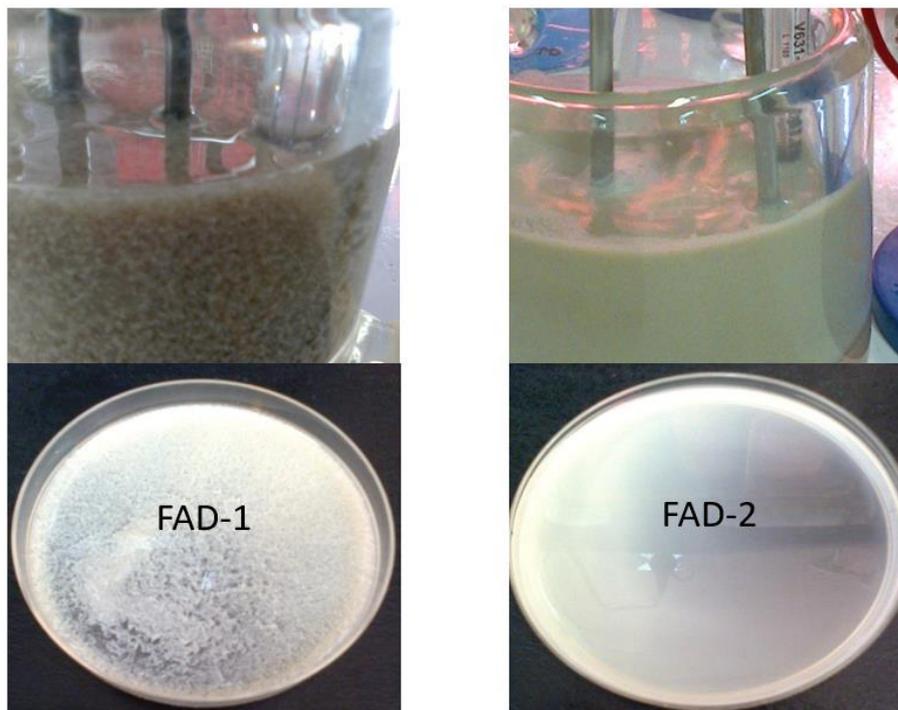
## 5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

O precipitado dos farelos desengordurados na indústria (FAD-1) e no laboratório (FAD-2), formado quando as proteínas anteriormente solubilizadas foram submetidas ao seu ponto isoelétrico, apresentou aspecto diferente, conforme visualizado na Figura 22.

**Figura 21-** Espectros de infravermelho dos concentrados (A) CPFAD-1 e (B) CPFAD-2.



**Figura 22-** Fotografia dos precipitados formados no ponto isoelétrico das proteínas dos Farelos 1 e 2.



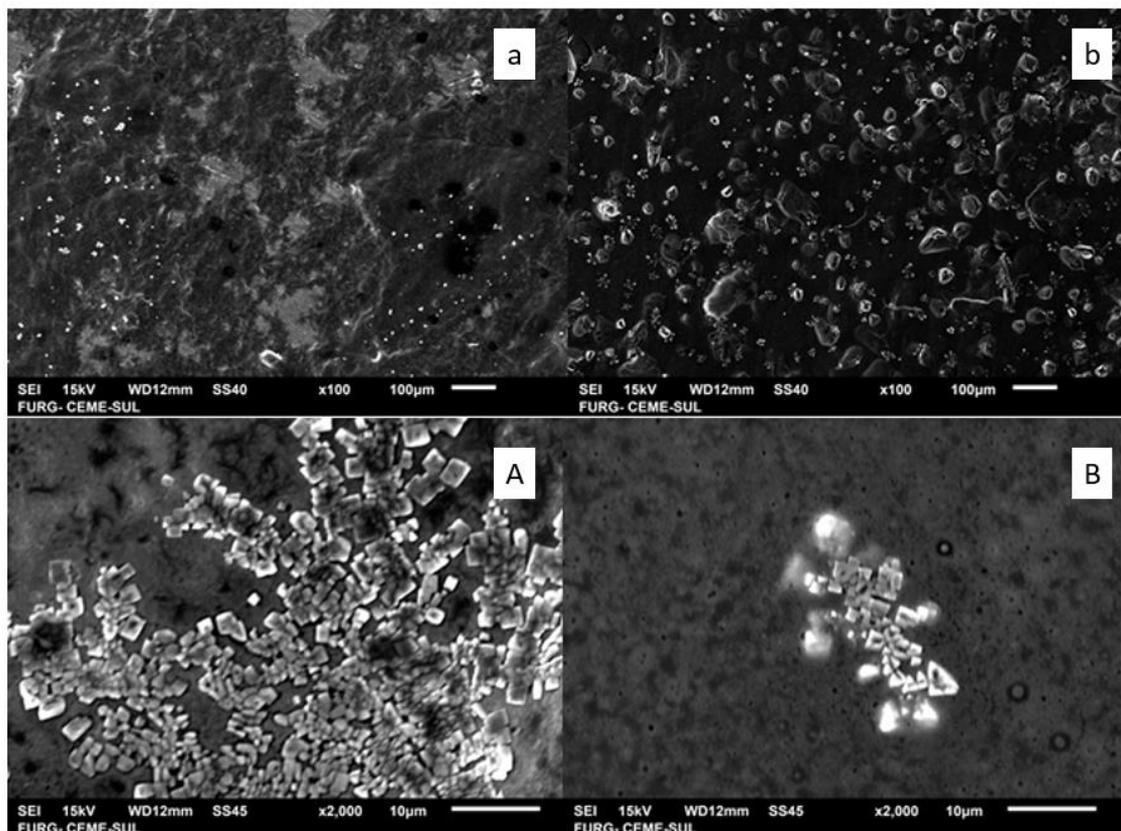
FAD-1: farelo de arroz desengordurado na indústria; FAD-2: farelo desengordurado no laboratório.

Na microscopia eletrônica de varredura é possível verificar as formas correspondentes de determinados materiais. Durante a produção dos concentrados foi possível observar uma diferença no modo de agregação e formação do precipitado, no ponto isoelétrico das proteínas solubilizadas. Nas placas se observam os precipitados com aspecto diferente, onde o CPFAD-1 (A) aparece na forma de grumos separados da parte aquosa comparado com o CPFAD-2 (B), que possui um aspecto mais homogêneo.

Na Figura 23 está ilustrado os precipitados secos analisados por microscopia eletrônica de varredura, observando melhor a morfologia desses precipitados úmidos, correspondentes aos concentrados.

A estrutura de uma proteína é resultado de diferentes ações atrativas e repulsivas referentes ao meio em que se encontra. Alterações como o pH, temperatura, força iônica são capazes de fazer com que haja uma readaptação conformacional. No entanto, mudanças drásticas na estrutura quaternária, terciária e secundária da proteína demonstram que houve a desnaturação proteica, não havendo alteração química da molécula, porém a transformação de uma molécula na forma ordenada, nativa, para uma estrutura desordenada (FENNNEMA; DEMODORAN; PARKING, 2010).

**Figura 23-** Microscopia eletrônica de varredura dos precipitados da proteína extraída do FAD-1 (a – 100x; A – 2.000x) e FAD-2 (b – 100x; B – 2.000x).



FAD-1: farelo de arroz desengordurado na indústria; FAD-2: farelo desengordurado no laboratório.

Ao final, essas modificações estruturais podem alterar no modo em que as moléculas se agrupam quando expostas ao pH indicado no ponto isoelétrico. Em função disso, as proteínas concentradas obtidas nestas condições, podem apresentar diferenças na sua estrutura, além de propriedades modificadas, como a digestibilidade e a estabilidade térmica, além de muitas outras o qual dependem da conformação em que estão estas proteínas.

## 5.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E HIDRÓLISE DA PROTEÍNA CONCENTRADA DO FARELO DE ARROZ

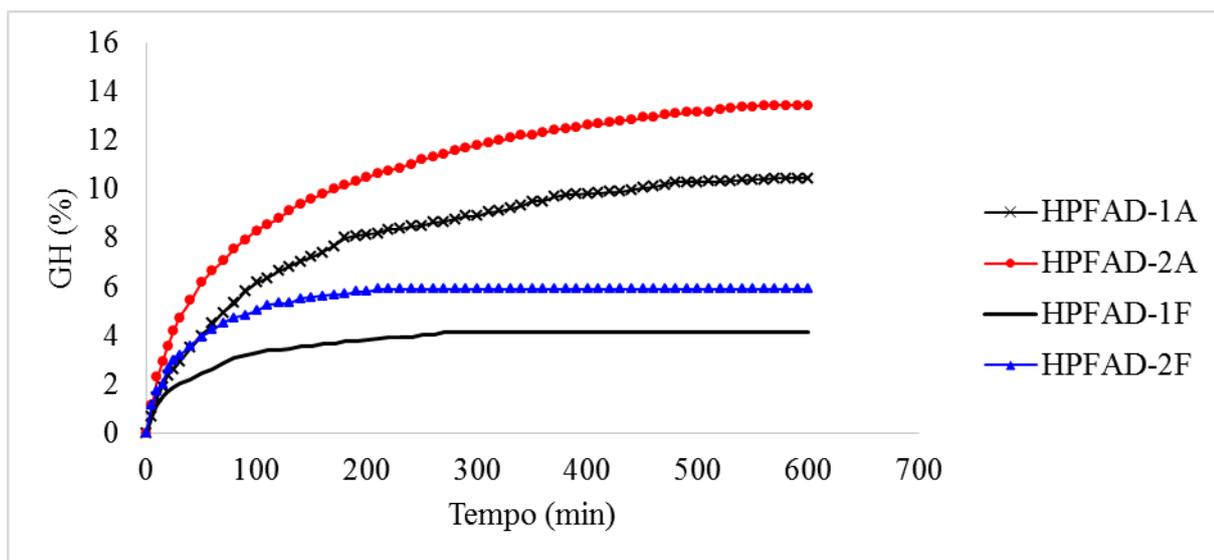
Antes de realizar a hidrólise das proteínas concentradas do farelo de arroz, verificou-se a atividade enzimática das enzimas Alcalase e Flavourzyme. Para isso, após a hidrólise da caseína, proteína padrão utilizada no protocolo, foi verificada que a atividade enzimática da Alcalase foi de 336,76 U/mL, apresentando uma concentração de proteínas de 22,56 mg/mL.

A enzima Flavourzyme apresentou a atividade menor que a Alcalase, sendo de 15,39 U/mL e a concentração de proteína na enzima de 19,13 mg/mL.

Segundo Zavareze et al.(2009) a caseína é a proteína mais utilizada como substrato para medida da atividade específica de enzimas proteolíticas em condições neutras ou alcalinas. Estes autores obtiveram valores distintos de atividade, em função da metodologia de avaliação ter sido diferente, porém a Alcalase também apresentou maior atividade enzimática comparada com a Flavourzyme.

Efetuuou-se a hidrólise acompanhando os volumes de NaOH adicionado ao meio para manter o pH utilizado em cada reação, obtendo assim o grau de hidrólise em tempos específicos. Na Figura 24 estão apresentadas as curvas que ilustram a cinética de hidrólise dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2, ambos com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

**Figura 24-** Cinética de hidrólise dos concentrados CPFAD-1 e CPFAD-2 com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.



HPFAD-1A: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-1 com a enzima Alcalase; HPFAD-2A: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-2 com a enzima Alcalase; HPFAD-1F: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-2F: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme;

Através das curvas obtidas na reação de hidrólise total das proteínas concentradas do farelo de arroz é possível analisar um aumento acentuado do GH em todas as amostras até o período de 30 min, sendo que as curvas de GH obtidas com a enzima Alcalase seguiram com o comportamento ascendente até 540 min, ou seja após 9 h de reação. O platô formado pelas amostras hidrolisadas com a enzima Flavourzyme foi alcançado mais rapidamente, ou seja, em 3 h e 30 min (HPFAD-1F) e 4 h e 30 min (HPFAD-2F) de hidrólise. A taxa de aumento

de GH é maior no período inicial da reação, diminuindo com o tempo. De acordo com Guerard et al. (2002), a redução da taxa de reação é devido à limitação da atividade da enzima e à diminuição da concentração de substrato disponível.

Os graus de hidrólise máximos de cada amostra foram de 10,4% (HPFAD-1A), 13,4% (HPFAD-2A), 4,2% (HPFAD-1F) e 5,9% (HPFAD-2F). Com esses resultados, foi possível observar que ambos hidrolisados do concentrado CPFAD-1 apresentaram GH inferiores, comparado com o CPFAD-2. Isso pode ser explicado pelo fato das proteínas do CPFAD-2 estarem mais desnaturadas, facilitando a ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme, assim como ocorreu com as enzimas digestivas no ensaio de digestibilidade.

Por outro lado, analisando a ação das enzimas se verificou que Alcalase foi mais ativa em ambos os substratos, comparada com a Flavourzyme. Esse comportamento pode ser em função da enzima Alcalase ser uma endoprotease, que atua no interior da cadeia proteica e a Flavourzyme ser uma mistura de endo e exoproteases, atuando nos grupamentos aminos (aminopeptidase) e carboxílicos (carboxipeptidases), liberando no meio aminoácidos ou dipeptídeos. Piotrowicz; Mellado (2015) também encontraram valores de GH menores para a enzima Flavourzyme comparado com a Alcalase após 6 horas de hidrólise do músculo de peixe.

Silpradit et al. (2010) estudaram a otimização da obtenção de hidrolisados proteicos de farelo de arroz com a enzima Alcalase, apresentando graus de hidrólises que variaram de 1,8% a 12,6% em reações realizadas a 50 °C, variando o tempo e a relação enzima/substrato. Uraipong; Zhao(2015) promoveram a hidrólise de frações proteicas de farelo de arroz, onde em todas as frações a Alcalase apresentou maior grau de hidrólise comparada com a Flavourzyme, ambas com valores abaixo de 15%.

Após a obtenção dos hidrolisados foi realizada a ultrafiltração de todos os hidrolisados em membranas de 3 kDa, promovendo uma maior separação e purificação dos peptídeos obtidos, sendo esses submetidos às análises de capacidade antioxidante e anti-hipertensivo.

## 5.10 PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS PROTEÍNAS, HIDROLISADOS E PEPTÍDEOS DE FARELO DE ARROZ

A propriedade antioxidante das proteínas concentradas, hidrolisados e peptídeos ultrafiltrados obtidos do farelo de arroz foi verificada pela capacidade de absorção de radicais oxigênio e pelo poder redutor. As propriedades antioxidantes são dependentes de fatores

como: a composição e a sequência de aminoácidos, o tamanho do peptídeo, sendo que estudos mostraram que um alto grau de hidrólise não está diretamente relacionado com uma alta atividade antioxidante (NEVES et al., 2006)

Outra propriedade analisada neste trabalho foi a anti-hipertensiva, sendo avaliada pela capacidade dos peptídeos de farelo de arroz ultrafiltrados (menores de 3 kDa) inibirem a ação da enzima conversora da angiotensina (IECA). A habilidade de diminuir e/ou prevenir problemas cardiovasculares, como a hipertensão, normalmente é encontrado em peptídeos de baixa massa molecular, pois esses são capazes de entrar na corrente sanguínea e atuar como inibidores da conversão da angiotensina I em angiotensina II (MÖLLER et al., 2008a).

### **5.10.1 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)**

As proteínas desnaturadas e nativas, hidrolisadas e ultrafiltradas, foram analisadas quanto à capacidade de neutralizar os radicais peróxidos formados pela degradação térmica do AAPH, sendo relacionado com o antioxidante padrão Trolox. Na Tabela 8 estão presentes as médias dos valores de ORAC relacionadas com a quantidade de amostra utilizada na reação.

Observou-se que os maiores valores de ORAC foram obtidos pelas amostras de frações peptídicas de massa molar menor que 3 kDa, variando de 720,03 a 1040,27  $\mu\text{mol eq Trolox/g}$ . Os hidrolisados apresentaram valores menores, variando de 273,88 a 508,02  $\mu\text{mol eq Trolox/g}$  e, por último, os concentrados proteicos, obtendo menores valores de atividade antioxidante, sendo 111, 15  $\mu\text{mol eq Trolox/g}$  para o CPFAD-1 e 256,50  $\mu\text{mol eq Trolox/g}$  para o CPFAD-2.

Os peptídeos menores que 3 kDa obtidos a partir do CPFAD-2, para ambas as enzimas, foram os que apresentaram maior capacidade de absorção de radicais oxigênio, não havendo diferença significativa entre eles. Isso possivelmente ocorreu em função da purificação que foi realizada ao separar uma mistura de peptídeos de diferentes tamanhos e composição para um padrão de peptídeos de massa molecular menor de 3 kDa. Dentre os hidrolisados a amostra HPFAD-2A foi a que apresentou melhor atividade antioxidante e diferiu estatisticamente apenas da amostra HPFAD-1F, que apresentou semelhança significativa com o concentrado CPFAD-2. Outro ponto importante que se analisou foi que, tanto nos concentrados quanto nos hidrolisados e frações peptídicas, os valores de ORAC foram maiores nas amostras provenientes do farelo FAD-2.

**Tabela 8-** Atividade antioxidante das proteínas concentradas, hidrolisadas e peptídeos menores de 3 kDa determinadas por ORAC.

Amostras	Atividade antioxidante ( $\mu\text{mol eq Trolox/g amostra}$ )
CPFAD-1	111,15 <sup>g</sup> $\pm$ 5,30
CPFAD-2	256,50 <sup>f</sup> $\pm$ 10,26
HPFAD-1A	385,81 <sup>d,e</sup> $\pm$ 12,02
HPFAD-2A	508,02 <sup>d</sup> $\pm$ 14,42
HPFAD-1F	273,88 <sup>e,f</sup> $\pm$ 13,99
HPFAD-2F	391,68 <sup>d,e</sup> $\pm$ 53,36
HPFAD-1A<3	886,76 <sup>c</sup> $\pm$ 32,13
HPFAD-2A<3	1029,03 <sup>a</sup> $\pm$ 83,72
HPFAD-1F<3	720,03 <sup>b</sup> $\pm$ 20,06
HPFAD-2F<3	1040,27 <sup>a</sup> $\pm$ 73,16

CPFAD: Concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado (1: no laboratório; 2: na indústria); HPFAD-1A: hidrolisado proteico de CPFAD-1 com a enzima Alcalase; HPFAD-2A: Hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Alcalase; HPFAD-1F: Hidrolisado proteico do CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-2F: Hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Média  $\pm$  desvio padrão de três determinações. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Comportamento semelhante ocorreu no estudo realizado por Wattanasiritham et al. (2016) quando comparou as amostras de proteínas de farelo de arroz desnaturadas e nativas, hidrolisadas com tripsina ou não, onde as amostras hidrolisadas apresentaram maior capacidade de associação com os radicais peróxidos, sendo que as desnaturadas foram as que mais se destacaram. Como foi discutido anteriormente, proteína desnaturada pode ser facilmente hidrolisada, por estarem mais disponíveis os aminoácidos e possíveis ligantes dos sítios ativos de enzimas.

Hatanaka et al., (2015) avaliaram a capacidade antioxidante pelo método de ORAC de peptídeos obtidos de proteínas concentradas de farelo de arroz com a enzima Umamizyme G, obtendo o valor de 670,70  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , correspondente à peptídeos com diferentes bioatividade estudado por Hatanaka et al., (2012). Os peptídeos menores de 3 kDa apresentaram valores mais elevados, sendo mais eficientes que os peptídeos obtidos com a enzima Umamizyme G, que é classificada com uma mistura de endo e exopeptidase.

O aumento da atividade antioxidante a partir das proteínas concentradas, depois hidrolisadas e, por fim, fracionadas pode estar relacionada com a possibilidade dos peptídeos

e aminoácidos apresentarem maior potencial antioxidante é devido à sua capacidade de doar hidrogênios para neutralizar o radical peróxido e quanto menor a cadeia e o tipo de aminoácido presente maior será o seu potencial (ALVES et al., 2010; OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

### 5.10.2 Poder Redutor

A propriedade redutora de componentes também pode ser verificada pela habilidade que o antioxidante possui para transferir um elétron para a redução de radicais, metais ou carbonilas, utilizando como indicativo a mudança de cor do oxidante (SUN; TANUMIHARDJO, 2007). Na Tabela 9 estão apresentados os valores de poder redutor das amostras de concentrado, hidrolisado e peptídeos menores de 3kDa provenientes do farelo de arroz desengordurado.

**Tabela 9-** Absorbâncias referentes ao poder redutor das amostras de proteínas concentradas, hidrolisadas e peptídeos menores de 3 kDa provenientes do farelo de arroz.

Amostra	ABS (700 nm)
CPFAD-1	0,32 <sup>c</sup> ±0,03
CPFAD-2	0,55 <sup>b</sup> ±0,02
HPFAD-1A	0,33 <sup>c</sup> ±0,02
HPFAD-2A	0,51 <sup>b</sup> ±0,03
HPFAD-1F	0,33 <sup>c</sup> ±0,02
HPFAD-2F	0,53 <sup>b</sup> ±0,03
HPFAD-1A<3	0,47 <sup>b</sup> ±0,01
HPFAD-2A<3	0,53 <sup>b</sup> ±0,01
HPFAD-1F<3	0,96 <sup>a</sup> ±0,07
HPFAD-2F<3	0,88 <sup>a</sup> ±0,01

CPFAD: Concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado (1: no laboratório; 2: na indústria); HPFAD-1A: hidrolisado proteico de CPFAD-1 com a enzima Alcalase; HPFAD-2A: Hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Alcalase; HPFAD-1F: Hidrolisado proteico do CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-2F: Hidrolisado proteico do CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Média ± desvio padrão de três determinações. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Quanto maior o valor de absorbância maior é o poder redutor das amostras. Os peptídeos menores de 3 kDa obtidos com a enzima Flavourzyme foram os que apresentaram

maiores valores de poder redutor, destacando-se das demais amostras. Pode-se observar também que o concentrado obtido com o farelo de arroz desengordurado na indústria (CPFAD-2), não apresentou diferença significativa com os hidrolisados e peptídeos menores de 3 kDa obtidos a partir dele, ou seja, o concentrado foi tão eficiente quanto os seus produtos (hidrolisado e peptídeos menores de 3 kDa).

Tang et al.(2009) avaliaram o poder redutor de isolados e hidrolisados de trigo serrano com a enzima Alcalase em diferentes graus de hidrólises (GH), onde o hidrolisado que apresentou o GH igual a 10 apresentou valores próximos a 0,3 quando analisado na concentração de 2 mg/mL. Os hidrolisados com graus de hidrólise mais altos (GH=25%) não apresentaram diferença no poder redutor, porém em maiores concentrações de hidrolisado (5 mg/mL) foi possível obter valores de absorvância acima de 0,75. Piotrowicz e Mellado (2015), ao estudarem o efeito dos hidrolisados de anchoita, obtiveram valores de absorvância mais baixos que os de hidrolisados de farelo de arroz e os hidrolisados com a Alcalase foram mais efetivos que os obtidos com a Flavourzyme. Isso pode ser justificado pelo tipo de proteína estudada, além da condição de hidrólise ter sido diferente.

Os antioxidantes podem reagir de forma distinta, de modo que podem ser classificados conforme o seu mecanismo de ação. Como citado por Goufo; Trindade (2014), alguns antioxidantes podem agir na prevenção da iniciação da cadeia de oxidação (ORAC) e outros na capacidade de redução de determinado composto que sofreu a oxidação (Poder redutor). O mecanismo de atuação antioxidante vai depender da composição de aminoácidos e, na maioria das vezes, a capacidade antioxidante dos aminoácidos no polipeptídeo encontra-se limitada devido à conformação espacial que a proteína assume, onde os resíduos capazes de neutralizar os radicais livres se concentram no interior da molécula, dificultando o acesso das espécies reativas. A hidrólise da proteína provoca alterações na estrutura tridimensional e contribui para aumentar a exposição dos resíduos de aminoácidos, aumentando a sua atuação como quelante, sequestrador de radical, redutor de hidroperóxidos e de aldeídos (ELIAS, KELLERBY, DECKER, 2008).

### **5.10.3 Capacidade de inibição da ECA**

Propriedades anti-hipertensivas são de grande importância quando se tem interesse em avaliar os efeitos dos peptídeos na prevenção de doenças cardiovasculares. O mecanismo mais conhecido para avaliar a atividade anti-hipertensiva é através do efeito inibidor de peptídeos na ação da enzima conversora da angiotensina I em angiotensina II, esse último considerado

um potente vasoconstritor. Comumente se avalia a quantidade de um composto capaz de inibir 50% da atividade da ECA, como apresentado na Tabela 10.

**Tabela 10-** Inibição da ECA apresentada pelas frações peptídicas menores de 3 kDa provenientes do farelo de arroz desengordurado.

Amostra	IC <sub>50</sub> (mg amostra/mL)
HPFAD-1A<3	0,14 <sup>d</sup> ±0,02
HPFAD-2A<3	0,32 <sup>c</sup> ±0,08
HPFAD-1F<3	1,70 <sup>a</sup> ±0,16
HPFAD-2F<3	1,41 <sup>b</sup> ±0,05

HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Média ± desvio padrão de três determinações. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Analisando o potencial de cada peptídeo foi possível verificar que a enzima Alcalase foi mais efetiva em produzir peptídeos de farelo de arroz com melhor propriedade inibidora da ECA, visto que seria necessária uma quantidade menor de amostra para inibir 50% da ação da enzima, comparada com os peptídeos obtidos com a enzima Flavourzyme. Se tem conhecimento que peptídeos de baixa massa molecular apresentam maior poder de inibição comparado com peptídeos maiores. A fração menor de 3 kDa do hidrolisado proveniente da caseína, estudados por Miguel et al. (2009), também apresentou maior poder inibidor comparado com o hidrolisado e com a fração maior que 3 kDa.

Yang et al., (2011) avaliaram o valor de IC<sub>50</sub> de peptídeos provenientes do germe de trigo, obtendo o valor de 1,1 mg/ml para o extrato bruto. A partir desse, foram feitas diferentes etapas de purificação (precipitação com etanol, Sefadex G-25, Sefadex G-10, e DEAE-Sefarose FF), sendo que o produto obtido de cada etapa apresentava melhores resultados na capacidade anti-hipertensiva, sendo próximos aos obtidos nesse trabalho. Ao final, após a cromatografia de troca iônica (DEAE-Sefarose), alcançaram o valor de IC<sub>50</sub> de 0,07 mg/mL, a metade obtida pela amostra HPFAD-1A<3, demonstrando que os peptídeos menores de 3 kDa provenientes do concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado no laboratório e hidrolisados com a enzima Alcalase se mostraram muito eficientes como inibidores da ECA.

Chen et al.(2013) estudaram as propriedades anti-hipertensivas de hidrolisados e peptídeos obtidos da proteína de arroz comercial (Henan Huangguo Grain Co LTD-China)

após a hidrólise com a enzima Alcalase, até 16,2% de grau de hidrólise, seguindo o processo com Tripsina. Os autores obtiveram valores de  $IC_{50}$  de 0,280, 0,840 e 1,570 mg/mL dos peptídeos menores de 3 kDa, entre 3 e 10 kDa e maiores de 10 kDa, respectivamente. Mais uma vez comprovando que quanto menor é a massa molecular dos peptídeos melhor é a capacidade de inibir a ação da ECA. Cadeias de peptídeos com 2 a 5 aminoácidos e resíduos de prolina ou hidróxiprolina no C-terminal tem apresentado alto efeito inibidor da ECA, pois apresentam a capacidade de se ligar fortemente ao sítio ativo da enzima. Resíduos de aminoácidos como a lisina e arginina, no C-terminal de peptídeos, também estão relacionados como potentes inibidores de ECA (ERDMANN et al., 2008).

Rimón (2013) produziu hidrolisados de clara de ovo utilizando diferentes enzimas e comparando os valores de  $IC_{50}$  dos hidrolisados, obtidos em 8 horas de hidrólise, os peptídeos com a enzima Alcalase foram mais potentes que a Flavourzyme. Poucos estudos foram encontrados relacionados à capacidade anti-hipertensiva de peptídeos provenientes de fontes vegetais obtidos com a enzima Flavourzyme em comparação com a Alcalase, porém um trabalho realizado por Gao et al. (2010), com hidrolisados de semente de algodão utilizando diferentes enzimas, a atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase foi menor comparado com os produtos da reação com a Flavourzyme. O mesmo ocorreu com hidrolisados de albumina de ovo realizado por Kim et al. (2003). Isso pode ser devido às diferenças nas matérias primas, aos tipos de proteínas e às condições que foram submetidas à hidrólise.

Wan Mohtar et al. (2014) estudaram a hidrólise de uma espécie de feijão (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) com as enzimas Alcalase, Flavourzyme, Papaina e Bromelina em diferentes tempos de hidrólise, sendo que em 5 horas os produtos apresentaram valores de  $IC_{50}$  semelhantes aos peptídeos da amostra HPFAD-2A<3, não havendo diferença significativa entre os produtos obtidos com a Alcalase e a Flavourzyme. A suscetibilidade das proteínas concentradas do farelo de arroz perante a enzima Alcalase foi evidente quando se analisou o grau de hidrólise. Isso provavelmente proporcionou a produção de maior quantidade de peptídeos de baixa massa molecular, tornando-o um produto com alto poder de inibição da ECA.

## 5.11 ESTUDO *IN VIVO* DA PROPRIEDADE ANTI-HIPERTENSIVA DOS PEPTÍDEOS DE FARELO DE ARROZ

### 5.11.1 Estudo preliminar

Técnicas *in vitro* têm sido utilizadas para avaliar as propriedades bioativas de peptídeos provenientes de alimentos, sendo que a técnica mais utilizada é o poder inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA), como visto anteriormente. No entanto, estudos *in vivo* permitem avaliar com confiança o efeito dos peptídeos que apresentam propriedades anti-hipertensivas.

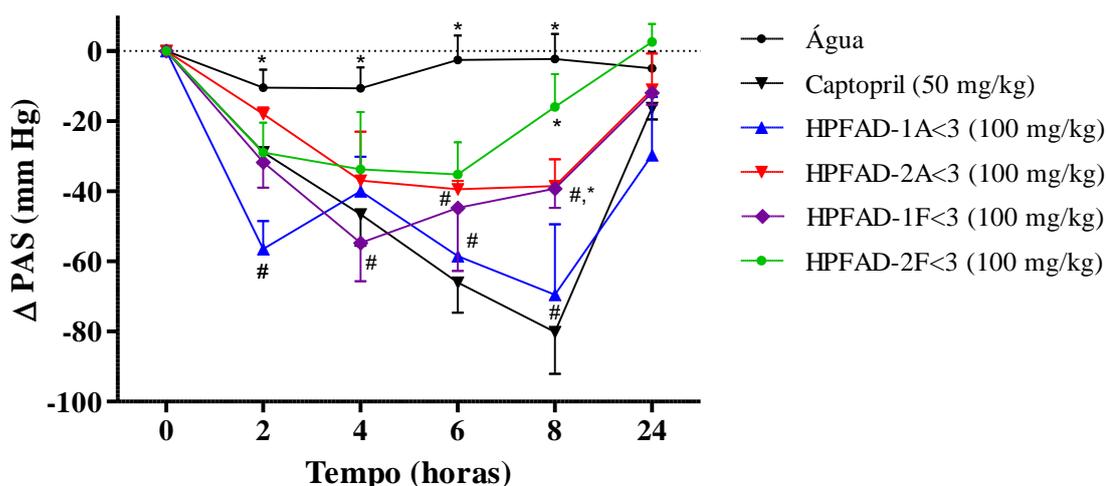
Ensaio agudos com os animais permitiram avaliar, em curto prazo, o efeito que os peptídeos de farelo de arroz apresentaram ao diminuir a pressão de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Esses animais apresentaram a pressão arterial sistólica (PAS) média diária de  $192 \pm 7$  mm Hg e a média da frequência de  $414 \pm 11$  bpm, sendo que no período entre 9 e 10 horas da manhã, quando se realizava as primeiras medidas, a PAS média foi de  $203 \pm 6$  mm Hg e BPM de  $460 \pm 19$ . Miguel et al. (2007a) trabalharam com o modelo SHR que apresentaram a PAS inicial de 217 mm Hg. Fritz et al. (2011) trabalharam com SHR que apresentaram a PAS média diária de aproximadamente 170 mm Hg. Esse baixo valor de PAS pode ser referente à idade dos animais que eram de 12 a 16 semanas. Como citado por Fazan; Silva; Salgado (2001) o modelo animal SHR começa a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7<sup>a</sup> e a 15<sup>a</sup> semanas, atingindo um platô entre a 20<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas, não havendo influência do sexo do animal nesse desenvolvimento.

Na Figura 25 está ilustrado o teste preliminar realizado para verificar o efeito da dosagem de 100 mg de proteína/kg de rato de cada peptídeo durante um período de 24 horas, acompanhada dos controles positivo (Captopril 50 mg/kg) e negativo (água).

A curva referente ao controle negativo (água) possibilita acompanhar o comportamento da PAS dos ratos durante o dia, onde foi possível verificar um aumento de pressão no período de 6 horas após a ingestão da água, não havendo diferença significativa com os outros horários. Nesse mesmo período, comparando o efeito dos peptídeos e do Captopril houve a diminuição da PAS, porém além do controle positivo, a amostra HPFAD-1A<3 apresentou a menor redução de PAS em 8 horas após a ingestão (-69 mm Hg), não havendo diferença significativa com o Captopril. Este resultado está condizente com a análise *in vitro* realizada nesse estudo, pois a amostra HPFAD-1A<3 foi a que apresentou a maior

capacidade de inibir a ECA, comparada com as outras amostras estudadas. Para essa amostra também se observa que após 2 horas de ingestão houve uma queda brusca de pressão, se diferenciando significativamente das demais amostras, inclusive do captopril.

**Figura 25-** Variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após a administração intragástrica de água, captopril e diferentes peptídeos menores de 3kDa.



HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 4-8 ratos. \*Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle positivo (Captopril); #Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle negativo (Água). ( $p < 0,05$ ).

Avaliando a diminuição da pressão nos períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas, em relação ao tempo zero, foi possível verificar que a amostra HPFAD-1A<3 a partir de 2 horas apresentou diferença significativa não retornando à pressão basal após 24 horas da administração dos peptídeos. Isso demonstra que o efeito anti-hipertensivo segue por maior tempo comparado com as demais amostras. Em função disso, constatou-se que seria essencial verificar também a pressão dos animais no período de 48 horas após ingestão das amostras.

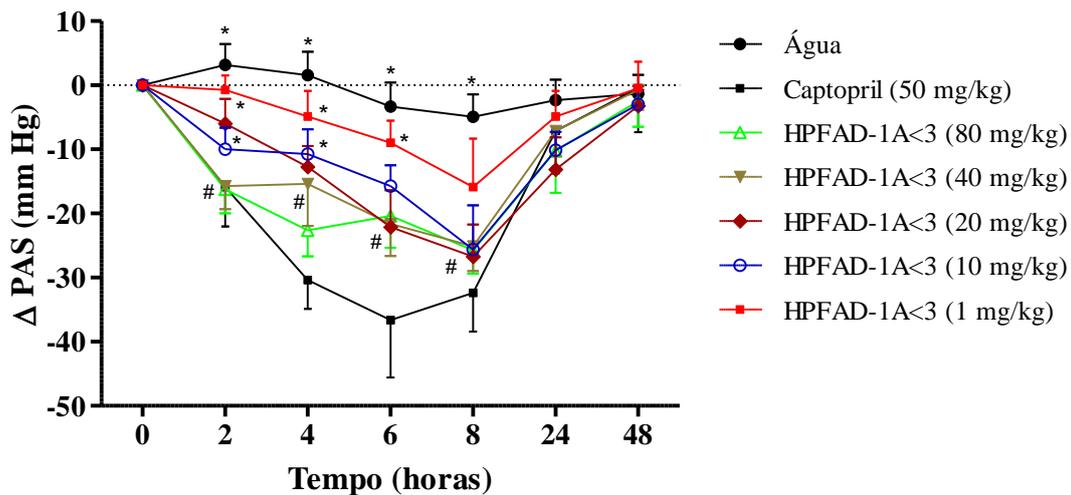
Miguel et al. (2009) estudaram o efeito de peptídeos menores de 3 kDa provenientes da caseína hidrolisada com pepsina e houve uma diminuição de 25 mm Hg na pressão arterial sistólica (PAS) dos SHR em 2 horas após a ingestão dos peptídeos, utilizando uma concentração de 200 mg/kg de animal. Peptídeos da clara do ovo hidrolisadas com pepsina também foram analisadas por MIGUEL et al. (2007 a), sendo que a fração menor de 3 kDa apresentou uma diminuição de aproximadamente 28 mm Hg após 6 horas de ingestão, utilizando a concentração de 100 mg/kg. Li et al. (2007) com hidrolisados proteicos de arroz

com a enzima Alcalase (600 mg/kg) apresentou a diminuição de pressão máxima em 6 horas após a administração oral em ratos SHR (~30 mm Hg). Esses autores avaliaram também o efeito do concentrado proteico, sendo que a concentração de 600 mg/kg não apresentou efeito significativo comparado com a água, comprovando que quanto menor o tamanho dos peptídeos melhor é a sua capacidade de atuar como anti-hipertensivo.

### 5.11.2 Efeito de diferentes concentrações de HPFAD-1A<3 na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos

Ao verificar no teste preliminar que os peptídeos presentes na amostra HPFAD-1A<3 foram mais eficazes, comparados com as demais amostras de peptídeos de mesma massa molecular, o estudo foi direcionado à dosagem dos peptídeos menores de 3 kDa provenientes do concentrado proteico obtido a partir do farelo desengordurado no laboratório, hidrolisado com a enzima Alcalase (HPFAD-1A<3) na PAS dos ratos SHR. Assim, testaram-se as concentrações de 80, 40, 20, 10 e 1 mg de amostra/kg de peso corporal do rato SHR (Figura 26).

**Figura 26-** Variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos após a administração intragástrica de água, captopril e diferentes doses dos peptídeos presentes em HPFAD-1A<3.



HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 8-12 ratos. \* Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle positivo (Captopril); # Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle negativo (Água). ( $p < 0,05$ ).

Os ensaios foram realizados em outro grupo de ratos SHR, sendo esta a segunda etapa do trabalho, como foi citado na metodologia 4.3.14, onde foram utilizados 15 ratos SHR e o período de avaliação dos peptídeos foi realizado até 48 horas após a administração dos peptídeos de farelo de arroz.

Observou-se que com a redução da concentração de 80 a 10 mg/kg de massa corporal o valor da PAS foi a mesma em 8 horas após a administração da amostra HPFAD-1A<3 e, apenas na concentração de 1 mg/kg, a eficácia do composto foi diminuída, não havendo diferença significativa do controle negativo (água). Comparando a ação anti-hipertensiva nos diferentes tempos de análise, em todas as concentrações avaliadas, apenas o período de 8 hs após a administração intragástrica dos peptídeos de HPFAD-1A<3 apresentou diferença significativa com o tempo zero.

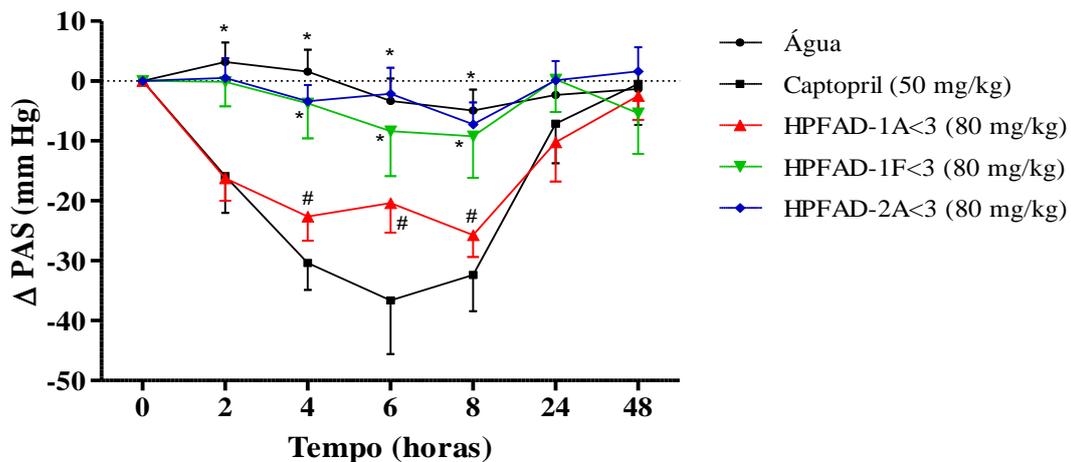
Miguel (2004) avaliou as concentrações de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg de peptídeos menores de 3 kDa provenientes da clara do ovo hidrolisados com pepsina, apresentando maior eficiência que os hidrolisados de farelo, pois apresentaram maior diminuição de pressão em 6 horas após a administração oral do produto. Porém os peptídeos de farelo de arroz foram mais potentes, pois na concentração de 10 mg/kg apresentaram maior queda de pressão (-27 mm Hg) comparado com 25 mg/kg dos peptídeos de ovo (-8 mm Hg). Chen et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes doses (50, 10 e 1 mg/kg) de peptídeos proveniente de borra de arroz (subproduto do xarope de arroz), hidrolisada com tripsina, na PAS de ratos SHR, obtendo a diminuição máxima da pressão em uma hora após a administração (-29 mm Hg / 50 mg/kg), retornando aos valores iniciais de PAS após 7 horas (193 mm Hg). Nas concentrações de 10 e 1 mg/kg a redução foi de 19 e 10 mm Hg, respectivamente. Em comparação com este trabalho com farelo de arroz, o efeito anti-hipertensivo do HPFAD-1A<3 foi mais prolongado, pois enquanto os peptídeos de borra de arroz obtiveram a máxima diminuição da PAS em uma hora após a administração oral, os peptídeos de farelo obtiveram valores semelhantes após 6 horas, período em que o efeito dos peptídeos da borra de arroz havia acabado, fazendo com que os valores da PAS retornassem ao inicial. Assim, os peptídeos de borra de arroz foram mais eficientes, porém menos eficazes.

Com esta análise verificou-se que os peptídeos presentes na amostra HPFAD-1A<3, na concentração de 80 a 10 mg/kg, apresentaram a mesma eficiência no tempo de 8 horas após a administração intragástrica.

### 5.11.3 Efeito de diferentes peptídeos de farelo de arroz na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos

A eficácia dos peptídeos menores de 3 kDa, provenientes do concentrado proteico obtido do farelo de arroz desengordurado no laboratório e hidrolisado com a enzima Alcalase (HPFAD-1A<3), poderia estar relacionado com o tipo de enzima ou com o tipo de substrato. Para isso, testou-se na concentração de 80 mg de amostra/kg de peso de rato os peptídeos provenientes do mesmo concentrado, porém hidrolisado com a enzima Flavourzyme (HPFAD-1F<3), e o concentrado obtido do outro farelo, desengordurado na indústria, porém hidrolisado com a enzima Alcalase (HPFAD-2A<3), tendo as curvas ilustradas na Figura 27.

**Figura 27-** Variação da pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após a administração intragástrica de água, captopril e diferentes peptídeos de massa molecular menor que 3 kDa na concentração de 80 mg/kg.



HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 8 ratos. \*Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle positivo (Captopril); #Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle negativo (Água). ( $p < 0,05$ ).

Nesta situação foi possível confirmar o potencial dos peptídeos de HPFAD-1A<3 no período de 8 horas, pois se verificou diferença significativa com as demais amostras em até 8 horas após a administração oral. Os peptídeos presentes nas amostras HPFAD-1F<3 e HPFAD-2A<3 não apresentaram diferença significativa com o controle negativo (água), ou seja, na dosagem de 80 mg/kg não houve efeito na diminuição da pressão arterial sistólica dos ratos espontaneamente hipertensos.

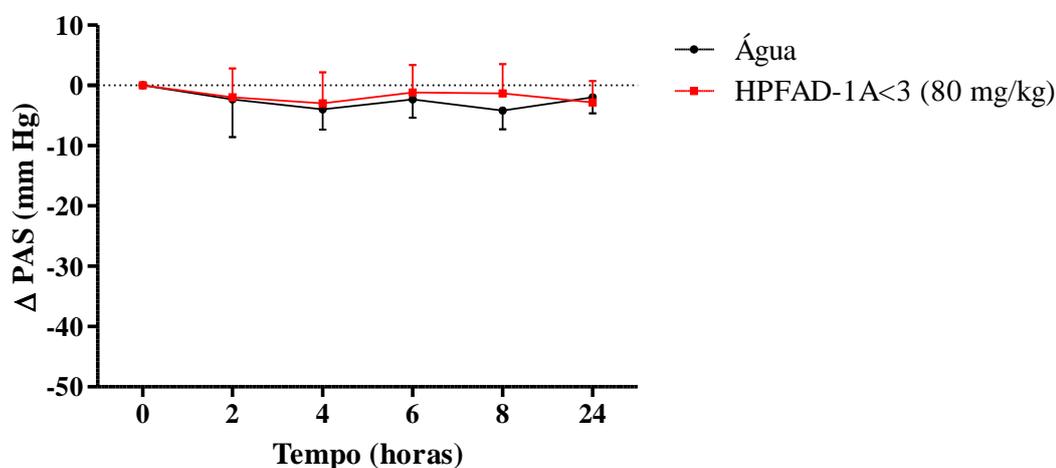
Nos testes preliminares, onde se utilizou doses maiores de amostra, foi constatado que, exceto a amostra HPFAD-1A<3, as demais não eram tão eficazes. Muitas vezes a dosagem alta de um composto bioativos pode causar efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente interferir no seu efeito benéfico ideal, como foi reportado por alguns pesquisadores (ANTOLOVICH et al., 2002; CARRASCO-CASTILLA et al., 2012).

Deste modo, como componentes com propriedades antioxidantes têm importância devido à sua relação no desenvolvimento de diversas doenças, uma delas a hipertensão, seria interessante conhecer o comportamento da pressão arterial dos animais em uma dosagem menor. Neste caso, o efeito não foi constatado, tornando evidente que o potencial do produto está ligado ao concentrado obtido do farelo desengordurado no laboratório e hidrolisado com a enzima Alcalase, processo que produziu peptídeos de baixa massa molecular com propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas.

#### 5.11.4 Efeito dos peptídeos de HPFAD-1A<3 na pressão arterial de ratos normotensos (Wistar-Kyoto)

Foi avaliado também se os peptídeos de HPFAD-1A<3 não influenciariam na pressão arterial de ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY). Para isso se obteve as medidas da PAS de 10 ratos WKY, com a média de peso corporal de 413±30 g, comparando o efeito da amostra em relação ao controle negativo, sendo os valores apresentados na Figura 28.

**Figura 28-** Pressão arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) obtido de ratos Wistar-Kyoto (WKY) após a administração intragástrica de água e dos peptídeos de HPFAD-1A<3 (80 mg/kg).



HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média ± erro padrão de 6 ratos.

A média da PAS diária dos ratos WKY foi de  $138 \pm 2$  mm Hg, sendo que no período inicial do dia (9-10 horas da manhã) a PAS foi de  $140 \pm 10$  mm Hg. Verificou-se que não houve grandes variações na PAS dos ratos WKY que foram sondados com água e com a amostra HPFAD-1A $<3$ , comprovando que o efeito na diminuição da pressão arterial ocorre apenas em animais que apresentam a pressão alta. O efeito hipotensivo não deve ser verificado nesse modelo animal, como foi avaliado e confirmado por Miguel et al. (2005) com hidrolisados de clara de ovo e Mugerza et al.(2006) com hidrolisados de leite, quando estudaram o efeito dos peptídeos em ratos WKY.

Através da análise da pressão arterial sistólica (PAS) de animais hipertensos e normotensos foi possível constatar que os peptídeos obtidos através da hidrólise das proteínas concentradas, proveniente do farelo preparado em laboratório, tratadas com a enzima Alcalase foram os mais eficazes na redução da PAS de ratos hipertensos, porém não causaram nenhum efeito em animais que não apresentam problemas de pressão alta, sendo esse o início para outros estudos relacionado à ação anti-hipertensiva de peptídeos de farelo de arroz.

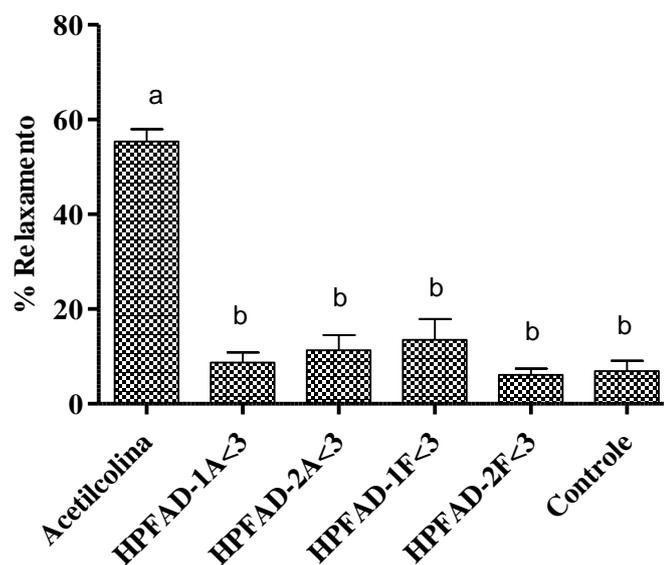
## 5.12 REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA DE RATOS SHR

Estudos apontam que diferentes mecanismos podem estar relacionados com o efeito da diminuição da pressão arterial exercida por diversos peptídeos derivados de alimentos (MIGUEL, 2004; MIGUEL et al., 2007a). A reatividade vascular consiste em um mecanismo de atuação direta de peptídeos sobre o músculo vascular liso.

Na Figura 29 estão apresentadas as porcentagens de relaxamento, com relação à metoxamina, em resposta à acetilcolina e às soluções contendo os peptídeos menores de 3 kDa provenientes do farelo de arroz.

Através do ensaio de reatividade dos anéis de aorta, a diferença da contração média ao KCl, em relação à tensão basal de 2 g, foi de  $1,66 \pm 0,24$  g. Em seguida, no teste da integridade do endotélio, a diferença média de contração em presença da metoxamina foi de  $1,11 \pm 0,16$  g, verificando o valor médio de  $53,27 \pm 8,64\%$  de relaxamento dos anéis com a acetilcolina. O comportamento dos anéis em contato direto com os diferentes peptídeos de farelo de arroz foi analisado em 5 e 15 minutos, verificando que não houve efeito relaxante nos anéis, pois as porcentagens de tensão não diferiram do anel controle, em que nenhuma solução de peptídeos foi adicionada.

**Figura 29-** Valores correspondentes ao comportamento dos anéis de aorta controle e em presença da acetilcolina e dos peptídeos menores de 3 kDa.



HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 4-8 ratos.

Os anéis apresentaram uma resposta vasodilatadora diminuída à acetilcolina, substância caracterizada por promover uma dilatação dependente da ação endotelial nos vasos. A partir disso, pode-se constatar que o endotélio presente no anel deste tipo de animal apresentava danos. Segundo Perasa (2013), em função da disfunção endotelial os vasos sanguíneos deixam de dilatar como antes e a pressão arterial é mantida em níveis mais elevados.

O comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio era esperado para o modelo animal de hipertensão SHR, sendo que para outros animais a porcentagem média de relaxamento pode estar entre 60 a 80% (BOONLA et al., 2015; MIGUEL et al., 2007a, 2007b, 2007c) ou até menor, dependendo do estágio de vida em que se encontra o animal. Os ratos SHR apresentam uma disfunção endotelial, que pode ser definida como o desequilíbrio entre a ação de substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras produzidas pelo endotélio (PERASA, 2013). Estudos em vasos de ratos SHR demonstram o aumento da produção de ânion superóxido endotelial, sendo relacionada com o comprometimento de relaxamentos dependentes do endotélio (GRUNFELD et al., 1995).

Quando os anéis foram submetidos ao tratamento com as amostras de peptídeos menores de 3 kDa de farelo de arroz, observou-se que a porcentagem de relaxamento foi

muito baixa ou nula. Algumas suposições podem ser feitas com relação a esse resultado, visto que peptídeos que apresentam propriedades anti-hipertensivas normalmente são capazes de atuar no músculo vascular liso promovendo o seu relaxamento (BOONLA et al., 2015; GARCIA-REDONDO et al., 2010; JUSTO et al., 2013; MIGUEL et al., 2007d).

A primeira hipótese estaria relacionada com o modelo animal, o qual apresenta uma hipertensão arterial severa devido a fatores de ordem genética de caráter poligênico que resultam em um comprometimento endotelial intenso. Dessa forma, a severidade do quadro disfuncional poderia estar impedindo a observação de relaxamento do anel pelos peptídeos. Justo et al. (2013) e Boonla et al. (2015) encontraram efeitos vasodiladores de peptídeos de farelo de arroz ao realizarem estudo de reatividade vascular em anéis de aortas de ratos obesos da raça Zucker e os da raça Sprague-Dawley submetidos às alterações na artéria renal (2K-1C), respectivamente. Ambos modelos desenvolvem uma forma mais branda de hipertensão, o que poderia justificar as divergências nos efeitos vasodiladores promovidos pelos peptídeos entre esses autores e o presente estudo.

A segunda hipótese estaria relacionada ao protocolo experimental aplicado. O fato do hidrolisado não ter apresentado uma ação direta vascular não significa que ele não possa desempenhar uma ação sistêmica sobre outros fatores desencadeantes da hipertensão observada no modelo SHR, como fatores neurais, renais ou hormonais. Isso pode ser sugerido tendo em vista que foi observada redução na hipertensão após a ingestão do hidrolisado pelos ratos, embora sem alterações no relaxamento vascular direto em resposta à incubação dos peptídeos. Sendo assim, a realização de outros protocolos experimentais, visando à realização de curvas concentração-resposta a drogas vasoconstritoras (metoxamina) e vasodilatadoras (acetilcolina) precedidas da incubação *in vitro* dos peptídeos ou a realização dessas curvas após a ingestão aguda ou crônica dos hidrolisados pelos ratos poderiam ser alternativas para verificação e comprovação da existência de efeitos sistêmicos dos hidrolisados estudados, como observados em protocolos desenvolvidos por outros autores (BOONLA et al., 2015; JUSTO et al., 2013; LEMOS et al., 2012).

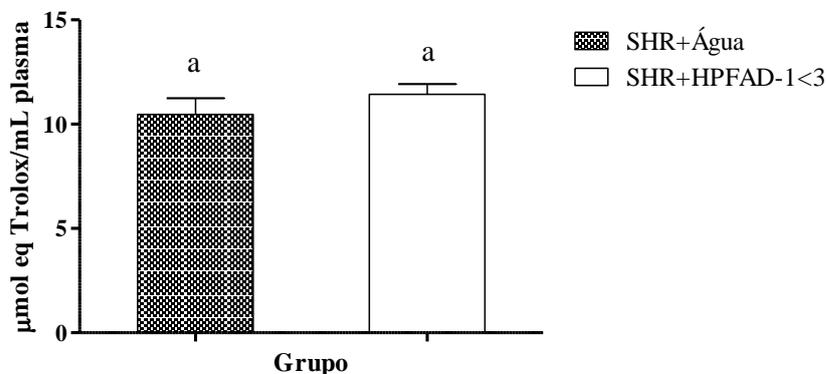
### 5.13 TESTES BIOQUÍMICOS EM PLASMA E FÍGADO DE RATOS SHR

#### 5.13.1 Atividade antioxidante das frações peptídicas de farelo de arroz em plasma de ratos SHR

Espécies reativas de oxigênio, que são geradas como parte do metabolismo celular e provenientes de contaminantes ambientais, são altamente instáveis e podem causar danos a componentes celulares, como a membrana, os ácidos nucleicos e as proteínas, se não forem neutralizadas. Nos organismos existem sistemas antioxidantes distintos que ajudam a manter um estado de equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes (RIMÓN, 2013).

Na Figura 30 está apresentada a capacidade antioxidante total do plasma, analisada pela capacidade de neutralização dos radicais peróxido do plasma pelo método fluorimétrico de ORAC.

**Figura 30-** Atividade antioxidante plasmática em ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3 medido através dos radicais livres de oxigênio (ORAC).



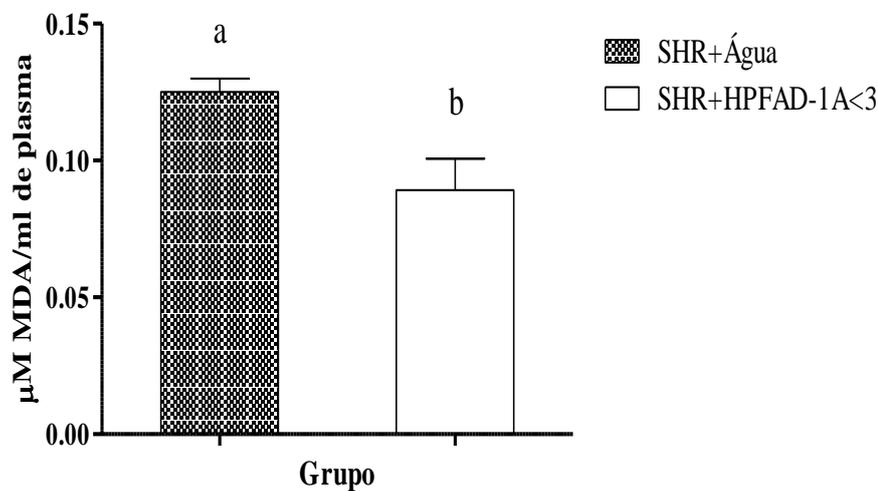
Grupos experimentais: (▨) Ratos SHR sondados com Água; (□) Ratos SHR sondados com HPFAD-1A<3 (80 mg/kg). Os dados representam média ± erro padrão de 7-8 animais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os animais controle e os sondados com os peptídeos da fração HPFAD-1A<3 ( $p < 0.05$ )

Observou-se que não houve diferença significativa entre a capacidade antioxidante plasmática de ratos SHR tratados com os peptídeos e os SHR controle (tratados com água). Rimón (2013) em seu estudo com ratos Zucker alimentados durante 12 semanas com diferentes hidrolisados de clara de ovo também não obteve diferença significativa na capacidade antioxidante do plasma entre os animais controle e os alimentados com um dos hidrolisados da clara de ovo obtido com a enzima pepsina. Em alguns casos, como foi analisado por Manso et al. (2008), o plasma de animais do modelo SHR que ingeriram

peptídeos de forma crônica, foi capaz de neutralizar a formação excessiva dos radicais peroxil. Esse estudo, com peptídeos de clara de ovo, foi realizado após a ingestão diária (20 semanas) dos peptídeos, o que pode ter influenciado os resultados, visto que, com os peptídeos de farelo de arroz neste estudo a ingestão foi aguda e de uma única dose.

A determinação dos níveis de MDA permite medir o grau de peroxidação lipídica. Na Figura 31 está ilustrada a relação dos valores de MDA dos ratos que foram sondados com os peptídeos em comparação com os ratos controles, que foram sondados com água.

**Figura 31-** Concentração de malonaldeído (MDA) em plasma dos ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3.



Grupos experimentais: (▨) Ratos SHR sondados com Água; (□) Ratos SHR sondados com HPFAD-1A<3 (80 mg/kg). Os dados representam média ± erro padrão de 6-8 animais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os animais controle e os sondados com os peptídeos da fração HPFAD-1A<3 ( $p < 0.05$ )

Os ratos sondados com a amostra HPFAD-1A<3 apresentaram redução significativa da concentração de malonaldeído plasmático comparado aos ratos que foram sondados com água. Esses dados confirmam a presença de peroxidação lipídica e estresse oxidativo nos ratos hipertensos e sugerem que os peptídeos de farelo de arroz apresentam uma atividade antioxidante, a qual pode justificar a melhora acentuada dos níveis pressóricos nesse grupo.

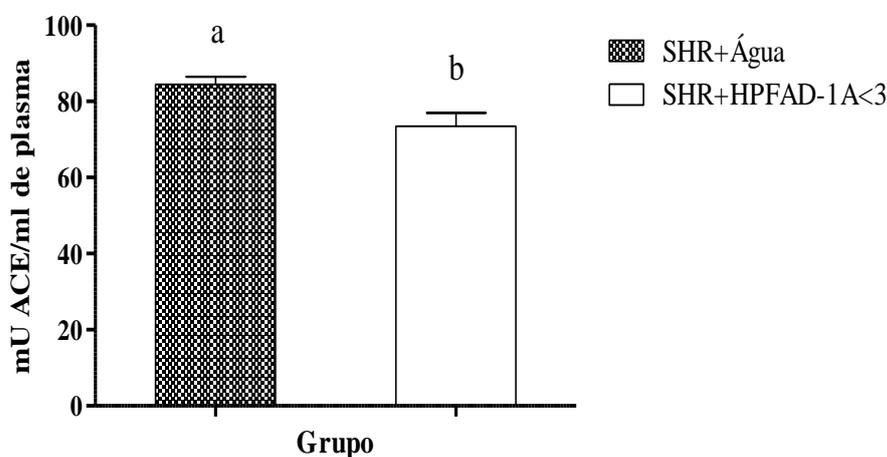
Estudos clínicos demonstraram aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA), peroxidação lipídica e estresse oxidativo em plasma de pacientes portadores de hipertensão essencial (TOUYZ, 2004). Em ratos com hipertensão renovascular (2K-1C), estudados por Boonla et al. (2015), a quantidade de MDA em plasma foi aumentada em função da hipertensão induzida e após o tratamento de seis semanas com hidrolisados de farelo de arroz os níveis de MDA apresentaram tendência à normalidade, sendo considerado

um dos fatores responsáveis pela normalização da pressão arterial dos animais. O estudo realizado por Manso et al. (2008) demonstrou que o consumo de peptídeos da clara de ovo, durante o período de 20 semanas, foi capaz de reduzir os níveis de MDA no plasma de ratos SHR, sendo que, após 5 dias sem a ingestão desses peptídeos houve um aumento substancial dos níveis de peroxidação lipídica que, segundo os autores, seria devido ao aumento do estresse oxidativo, causado pelo envelhecimento.

### 5.13.2 Efeito das frações peptídicas de farelo de arroz na atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) em plasma de ratos SHR

A maioria dos peptídeos com potencial anti-hipertensivo derivado de proteínas alimentares tem essa propriedade baseada na inibição da atividade da ECA. Na Figura 32 estão apresentados os valores de atividade da ECA no plasma de ratos SHR após 8 horas da administração oral com água e com os peptídeos de HPFAD-1A<3.

**Figura 32-** Atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) em plasma de ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3.



Grupos experimentais: (▨) Ratos SHR sondados com Água; (□) Ratos SHR sondados com HPFAD-1A<3 (80 mg/kg). Os dados representam média ± erro padrão de 6-8 animais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os animais controle e os sondados com os peptídeos da fração HPFAD-1A<3 ( $p < 0.05$ ).

Existem alguns estudos que demonstraram a inibição da atividade dessa enzima em aorta e rins, sendo essa condição a responsável pelo efeito anti-hipertensivo em ratos SHR (MIGUEL et al., 2007e). Outros autores também relacionaram o efeito anti-hipertensivo do hidrolisado de sardinha com a inibição da ECA em diferentes tecidos (aorta, rim e artéria

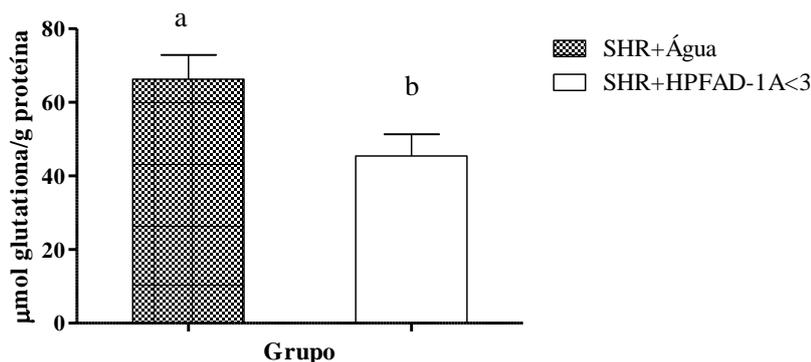
mesentérica) (Otaniet al., 2009). Rimón (2013) avaliou a atividade da ECA em plasma de ratos Zucker obesos tratados com hidrolisado de ovo, não havendo efeito significativo dos animais obesos que consumiram o hidrolisado com o controle, que consumiram água, sugerindo não ser este o mecanismo implicado nas alterações cardiovasculares observadas nesse modelo.

Boonlaet al. (2015) também avaliou a atividade da ECA no plasma de ratos com hipertensão renovascular (2K-1C) alimentados com hidrolisados de farelo de arroz por seis semanas e verificou que os hidrolisados reduziram a atividade da ECA.

### 5.13.3 Efeito das frações peptídicas de farelo de arroz níveis de glutathiona reduzida em fígados de ratos SHR

A glutathiona reduzida (GSH) atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Na Figura 33 estão apresentados os valores do nível de glutathiona reduzida no fígado de ratos SHR após 8 horas de administração com água (controle) e com os peptídeos presentes na amostra HPFAD-1A<3.

**Figura 33-** Concentração de glutathiona reduzida em tecido hepático de ratos SHR controle e tratados com HPFAD-1A<3.



Grupos experimentais: (▨) Ratos SHR sondados com Água; (□) Ratos SHR sondados com HPFAD-1A<3 (80 mg/kg). Os dados representam média ± erro padrão de 6-8 animais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os animais controle e os sondados com os peptídeos HPFAD-1A<3 ( $p < 0.05$ )

Os ratos SHR controles apresentaram um nível elevado de glutathiona e que a ingestão do HPFAD-1A<3 foi capaz de normalizar os níveis no tecido hepático. Estudos indicam que o estresse oxidativo induz à hipertensão essencial e que um dos principais sistemas alterados

nessa condição é o da glutathiona, o qual, por meio da atividade de suas enzimas, é importante para manutenção de níveis normais de glutathiona reduzida (GSH). A GSH é considerada um co-substrato para as enzimas glutathionaperoxidase (GPx) e glutathionaredutase (GR) (DUARTE et al., 2001; ESLAMI, SAHEBKAR, 2014).

Duarte et al. (2001) avaliou o tratamento crônico da quercitina em ratos SHR e WKY mostrando que houve aumento da atividade da GPx nos ratos SHR tratados e, conseqüentemente, houve redução da concentração de malondialdeído no plasma e fígado dos SHR. Os ratos WKY não apresentaram diferença na concentração de GPx. Como foi possível verificar em nosso estudo, a ingestão dos peptídeos HPFAD-1A<3 ocasionou interferência no mecanismo relacionado ao estresse oxidativo, pois houve a redução da concentração de malondialdeído (MDA) no plasma. Assim, podemos sugerir que, o estresse oxidativo observado nos ratos SHR poderia estar relacionado à depleção enzimática do sistema glutathiona e, conseqüentemente a maior quantidade do seu co-substrato no tecido hepático dos ratos hipertensos, sendo portanto, um marcador de dano oxidativo nesse órgão. A ingestão dos peptídeos derivados do farelo de arroz, ao neutralizar o estresse oxidativo observado nesse modelo animal, poderia restaurar o sistema glutathiona, assim normalizando a função enzimática de enzimas como GPx e, conseqüentemente, restabelecendo a utilização regular de glutathiona reduzida nesse sistema.

Rizzetti et al. (2013) estudaram o efeito crônico de baixas concentrações de mercúrio em ratos Wistar, o que causou a diminuição da atividade de enzimas superóxido desmutase (SOD) e glutathionaperoxidase (GPx), demonstrando que os efeitos nocivos do mercúrio durante o seu acúmulo em humanos são principalmente devido à liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), ao aumento da peroxidação lipídica nas células e à redução das defesas antioxidantes, havendo a inativação das enzimas importantes e responsáveis pela defesa do organismo. No estudo de Rizzetti et al. (2013) houve um aumento de grupamentos tióis não enzimáticos, os quais estão relacionados aos níveis de glutathiona reduzida, no grupo tratado com mercúrio, comprovando que em situações de estresse oxidativo, há um desequilíbrio do ciclo da glutathiona, causado pela depleção de suas enzimas constituintes, o qual ocasiona aumento compensatório de glutathiona reduzida.

## 5.14 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudaram-se as condições para obter concentrados proteicos provenientes do farelo de arroz, desengordurado no laboratório (FAD-1) comparado ao

desengordurado na indústria (FAD-2), com o objetivo de produzir concentrados com maior conteúdo e rendimento proteico (CPFAD-1 e CPFAD-2). Alterando condições de relação FAD:H<sub>2</sub>O, temperatura e tempo de solubilização da proteína foi possível obter concentrados com rendimentos proteicos de 61,65% e 30,77% para os CPFAD-1 e CPFAD-2, respectivamente.

As características avaliadas nos concentrados com melhores rendimentos proteicos foram, além da composição química, a digestibilidade, a massa molecular, as propriedades térmicas, estruturais e morfológicas. Foi verificado o aumento notável do conteúdo de proteínas dos concentrados comparado com o farelo. O teor de proteínas dos farelos foi de 16,7% (FAD-1) e 17,9% (FAD-2) e dos concentrados foi de 63,6% (CPFAD-1) e 62,1% (CPFAD-2). A digestibilidade e estabilidade térmica foram maiores no CPFAD-2 comparado com o CPFAD-1. Ambos os concentrados apresentaram massa molecular abaixo de 50 kDa, sendo que o CPFAD-1 apresentou as bandas mais claramente visíveis que o CPFAD-2. Não houve diferença nas bandas obtidas pelos concentrados, porém a formação dos seus precipitados foi visivelmente diferente, apresentando o CPFAD-1 um precipitado granular comparado com o CPFAD-2, que apresentava um aspecto mais homogêneo.

Através da hidrólise dos concentrados com as enzimas Alcalase, obtendo os hidrolisados HPFAD-1A e HPFAD-2A, e com a Flavourzyme os hidrolisados HPFAD-1F e HPFAD-2F, foi observado que se obteve graus de hidrólise maiores com a enzima Alcalase (10,4% e 13,4%) comparada com a Flavourzyme (4,2% e 5,9%). Além disso, o CPFAD-2, com ambas as enzimas, teve as suas ligações peptídicas quebradas com maior facilidade comparado com o CPFAD-1. Todos os hidrolisados foram submetidos à ultrafiltração, separando os peptídeos menores de 3kDa.

As propriedades antioxidantes foram verificadas nos concentrados, hidrolisados e peptídeos menores de 3 kDa, verificando que os peptídeos apresentaram melhores propriedades antioxidantes medidas pelos ensaios de ORAC e Poder redutor, sendo que os peptídeos com a Flavourzyme foram mais eficazes que os obtidos com a Alcalase. Em relação à atividade inibidora da ECA, testada apenas nos peptídeos menores de 3 kDa, os produtos obtidos com a Alcalase foram mais eficazes, pois menor quantidade de amostra foi capaz de inibir 50% da atividade da ECA.

O estudo *in vivo*, realizados com ratos espontaneamente hipertensos (SHR), demonstrou que todos os peptídeos menores de 3 kDa foram eficientes na redução da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais, sendo que a amostra mais eficaz foi a fração denominada HPFAD-1A<3, sendo a mesma amostra que apresentou maior atividade inibidora da ECA. No

teste realizado com diferentes doses desses peptídeos demonstrou que diminuindo a concentração de peptídeo de 80 mg/kg até 10 mg/kg de peso corporal do animal, foi possível obter a mesma queda de pressão no tempo de 8 horas após a administração oral da solução contendo os peptídeos de HPFAD-1A<3. Apenas a concentração de 1 mg/kg se mostrou a diminuição da eficiência dos peptídeos. Além disso, esses peptídeos não apresentaram efeito hipotensor em ratos normotensos (Wistar-Kyoto).

Os peptídeos surtiram efeito positivo em todos os ensaios bioquímicos, não havendo diferença significativa apenas para a análise de ORAC. Com estas análises se pode verificar o alto potencial desses peptídeos menores de 3 kDa provenientes do farelo de arroz, considerando que um tratamento agudo (apenas 8 horas) causou tantos efeitos benéficos à um modelo animal que apresenta uma hipertensão genética muito forte.

## **6 CONCLUSÃO GERAL**

Nesta tese foi possível trabalhar as condições para se obter concentrados proteicos com maiores rendimentos, verificando as suas características químicas, térmicas, estruturais e morfológicas, sendo que o concentrado obtido do farelo desengordurado no laboratório apresentou maiores rendimentos e o desengordurado na indústria foi o que apresentou maior digestibilidade e estabilidade térmica. Através da hidrólise foi possível melhorar as características antioxidantes e anti-hipertensivas das proteínas concentradas, sendo que as frações menores de 3 kDa foram as mais eficazes. Em estudos com ratos espontaneamente hipertensos, os peptídeos menores de 3 kDa, provenientes do concentrado proteico do farelo processado no laboratório e hidrolisado com a enzima Alcalase, foi o mais eficaz e se mostrou muito eficiente bioquimicamente na sua atuação como antioxidante e anti-hipertensivo em um modelo animal com hipertensão genética.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

A partir das proteínas concentradas é possível aplicar outras enzimas e avaliar as suas propriedades bioativas (antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana, hipocolesterolêmica, dentre outras).

Concentrados e hidrolisados do farelo de arroz podem ser estudados quanto à sua ação após a digestão, visto que modificações na estrutura dos peptídeos, causadas por enzimas digestivas, podem afetar a sua propriedade bioativa.

Estudos mais aprofundados podem ser realizados com os peptídeos de farelo de arroz desengordurado, avaliando o seu efeito mediante um tratamento crônico em animais geneticamente hipertensos, verificando o seu efeito na reatividade vascular desses animais, visto que os ensaios realizados com os animais SHR com a ação direta dos peptídeos de farelo de arroz nos vasos não foram eficientes.

Os peptídeos menores de 3 kDa podem ser fracionados por HPLC, testando as bioatividade nas diferentes frações e, ao final, o que apresentar melhor resultado pode ser submetido ao sequenciamento, possibilitando a descoberta de novas sequências de peptídeos com propriedades antioxidante e anti-hipertensiva.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427 p.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 283–290, 2005.
- AKESON, W. R., STAHMANN, A. A. A Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation. **Journal of Nutrition**, 83, 257-261, 1964.
- ALAIZ, M.; BEPPU, M.; OHISHI, K.; KIKUGAWA, K. Modification of depidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidantion products in relation to macrophage scavenger receptor binding. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 1, p. 51–57, 1994.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANTOLOVICH, M. Prenzler, P. D; Patsalides, E.; Mcdonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.
- AOAC. **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists 17° ed., Gaithersburg, 2000.
- BANDYOPADHYAY, K.; CHAKRABORTY, C.; BARMAN, A. K. Effect of microwave and enzymatic treatment on the recovery of protein from Indian defatted rice bran meal. **Journal of oleo science**, v. 61, n. 10, p. 525–9, 2012.
- BANDYOPADHYAY, K.; MISRA, G.; GHOSH, S. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 1, p. 47–52, 2008.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho: Na Caracterização de Compostos Orgânicos**. Ed. 1, UFV - UNIV. FED. VICOSA. 189 p, 2007.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. ACRIBIA, 1997, 2ª Ed. 1134 p.
- BOFFETTA, P.; NYBERG, F. Contribution of environmental factors to cancer risk. **British Medical Bulletin**, v. 68, p. 71–94, 2003.
- BOONLA, O.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; PAKDEECHOTE, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PANNANGPETCH, P.; THAWORNCHINSOMBUT, S. Peptides-derived from thai rice bran improves endothelial function in 2K-1C renovascular hypertensive rats. **Nutrients**, v. 7, p. 5783–5799, 2015.
- BUÑAG, R. D.; BUTTERFIELD, J. Tail-cuff blood-pressure measurement without external preheating in awake rats. **Hypertension**, v. 4, p. 898-903, 1982.

CALVEY, N. Enzymes. **Surgery (Oxford)**, v. 22, n. 2, p. 48a–48b, 2004.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CARRASCO-CASTILLA, J. CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; JACINTO-HERNÁNDEZ, C.; ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1157–1164, 2012.

CARVALHO, H. M. C.; CARVALHO, H. M. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; DE CÁSSIA, R.; TOSTES, A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L. PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 2014.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 280–288, 2011.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 2, p. 592–597, 2007.

CHANPUT, W.; THEERAKULKAIT, C.; NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 3, p. 422–428, 2009.

CHEN, G. W.; TSAI, J. S.; SUN PAN, B. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 641–647, 2007.

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

CHEN, Q.; XUAN, G.; FU, M.; HE, G.; MB, W. W. Effect of angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptide from rice dregs protein on antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. **Asia Pacific and Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. Suppl 1, p. 281–285, 2007.

CIAN, R. E.; VIOQUE, J.; DRAGO, S. R. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. **Food Research International**, v. 69, p. 216–223, 2015.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 1637–1648, 1971.

DAMODARAN, S., AND J. E. KINSELLA. 1982. Effects of ions on protein conformation and functionality. Page 327 in Food protein deterioration – mechanisms and functionality. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 206. Am. Chem. Soc., Washington, DC.

DA SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 4, p. 487–491, 2006.

DÁVALOS A, MIGUEL M, BARTOLOMÉ B, LÓPEZ-FANDIÑO R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1939-1944, 2004.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DOS SANTOS, S. D. A.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M. PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399–1406, 2011.

DUARTE, J.; GALISTEO, M.; OCETE, M. A.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 221, p. 155–160, 2001.

EHLERS, P. I.; KIVIMÄKI, A. S.; TURPEINEN, A. M. KORPELA, R.; VAPAATALO, H. High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental hypertension. **The British journal of nutrition**, v. 106, n. 9, p. 1353–63, 2011.

ELIAS, R. J. KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

ELLEPOLA, S. W.; CHOI, S. M.; MA, C. Y. Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 1-2, p. 12–20, 2005.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643–654, 2008.

ESLAMI, S.; SAHEBKAR, A. Glutathione-s-transferase M1 and T1 null genotypes are associated with hypertension risk : A Systematic review and meta-analysis of 12 studies. **Current Hypertension Report**, v. 16, p. 432–441, 2014.

EUCLIDES, V.P.B.; MEDEIROS, S.R. Suplementação animal em pastagens e seu impacto na utilização da pastagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DAS PASTAGENS, 22, 2005, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 33-70.

FABIANA, C.; JUA, Y. A Review on rice bran protein: its properties and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 9, p. 816-827, 2011.

FARAJ, M. **Sistema renina-angiotensina-aldosterona**. In: GOMES, O. M. Fisiologia Cardiovascular Aplicada. Edicor, Minas Gerais. 2005. 606 p.

FAZAN, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 19–29, 2001.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. - 4ª Ed. 2010. Artmed

FIREMAN, A. K. B. T.; LÓPEZ, J.; FIREMAN, F. A. T. Qualidade da casca do ovo de poedeiras alimentadas com diferentes níveis de farelo de arroz desengordurado e **fitase**. **Archivo Latinoamericano de Producción Animal**, v. 7, n. 2, p. 97–108, 1999.

FOLTZ, M.; MEYNEN, E. E.; BIANCO, V.; VAN PLATERINK, C.; KONING, T. M. M. G. KLOEK, J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 4, p. 953–8, 2007.

FONTANARI, G. G. **Isolado proteico de farinha de semente de goiaba (*Psidium guajava*): caracterização de propriedades funcionais e térmicas**. 2006, 108 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

FRITZ, M.; VECCHI, B.; RINALDI, G.; AÑÓN, M C. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 878–884, 2011.

FROTA, K. DE M. G. **Efeito do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e da proteína isolada no metabolismo lipídico em hamsters hipercolesterolemizados**. 2007, 136 f. Dissertação (Mestrado em Internuidades em Nutrição Humana Aplicada). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FUJITA, H.; YOSHIKAWA, M. LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. **Immunopharmacology**, v. 44, n. 1-2, p. 123–127, 1999.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. “Endothelium-derived relaxing and contracting factors”. **The FASEP Journal**, v. 3, p. 2007–2018, 1989.

GAO, D.; CHANG, T.; LI, H.; CAO, Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 53, p. 8977–8983, 2010.

GARCIA-REDONDO, A. B.; Roque, F. R.; Miguel, M.; López-Fandiño, R. Salaices, M. Vascular effects of egg white-derived peptides in resistance arteries from rats. Structure-activity relationships. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1988–1993, 2010.

GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1365–1370, 2010.

GOLDHAMER, A. Where do you get your protein? **Health Science**, p. 12–15, 2009.

GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science and Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75–104, 2014.

- GRUNFELD, S.; HAMILTON, C. A.; MESAROS, S.; MCCLAIN, S. W.; DOMINICZAK, A F.; BOHR, D. F.; MALINSKI, T. Role of Superoxide in the Depressed Nitric Oxide Production by the Endothelium of Genetically Hypertensive Rats. **Hypertension**, vol. 26 (6), p. 854-857, 1995.
- GUADIX, A. ; GAUDIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZALÉZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmaceutica**, v. 41, n. 1, p. 79–89, 2000.
- GUERARD, F., GUIMAS, L. AND BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** , v.19, p.489–498, 2002.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? **Free radicals and antioxidants**, v. 344, n. 8924, p. 721–724, 1994.
- HAMADA, J. S. Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, p. 305–310, 2000.
- HARMAN, D. Aging: overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 1–21, 2001.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.
- HATANAKA, T.; INOUE, Y.; ARIMA, J.; KUMAGAI, Y.; USUKI, H.; KAWAKAMI, K.; KIMURA, M.; MUKAIHARA, T. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 797–802, 2012.
- HATANAKA, T.; URAJI, M.; FUJITA, A.; KAWAKAMI, K. Anti-oxidation activities of rice-derived peptides and their inhibitory effects on dipeptidylpeptidase-IV. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 479–485, 2015.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4501–4523, 2002.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C.-C. **Bioactive food peptides in health and disease**. Ed. InTech, 276 p., 2013.
- HONG, F.; Ming, L.; Yi, S.; Zhanxia, L.; Yongquan, W.; Chi, L. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 1062–1071, 2008.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.
- INOUYE, K. et al. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 717–723, 2009.
- IRGA, I. R. G. DO A. **Beneficiamento e saídas de arroz (base casca) do RS (t)**. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/conteudo/4215/safras>. Acesso em: 23/01/2016.

IUMB. Enzyme Nomenclature. Disponível em:

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/21/62.html>. Acessado em: 28/12/2015.

JÄKÄLÄ, P.; JAUHAINEN, T.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Milk protein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro protect endothelial function in vitro in hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 266–273, 2009.

JÄKÄLÄ, P.; VAPAATALO, H. Antihypertensive peptides from milk proteins. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 251–272, 2010.

JE, J. Y.; QIAN, Z. J.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 840–846, 2007.

JIAMYANGYUEN, S.; SRIJESDARUK, V.; HARPER, W. J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 55–64, 2005.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular diabetology**, v. 4, n. 1, p. 5, 2005.

JOSHI, M.; ADHIKARI, B.; ALDRED, P.; PANOZZO, J. F.; KASAPIS, S. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1513–1522, 2011.

JOSHI, V. D.; DAHAKE, A. P.; SUTH, A. P. Adverse effects associated with the use of antihypertensive drugs : An overview. **International Journal of Pharmacology Research**, v. 2, n. 1, p. 10–13, 2010.

JUSTO, L. M.; ADHIKARI, B.; ALDRED, P.; PANOZZO, J. F.; KASAPIS, S. Rice bran enzymatic extract restores endothelial function and vascular contractility in obese rats by reducing vascular inflammation and oxidative stress. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1453–1461, 2013.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539–550, 2000.

KAMENCIC, H.; LYON, A.; PATERSON, P. G.; JUURLINK, B. H. J. Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure. **Analytical Biochemistry**, v. 286, p. 35–37, 2000.

KANNAN, A.; HETTIARACHCHY, N. S.; MAHEDEVAN, M. Peptides derived from rice bran protect cells from obesity and alzheimer's disease. **International Journal of Biomedical Research IJBR**, v. 3, n. 3, p. 131–135, 2012.

KARAS, M. ; JAKUBCZYK, A.; SZYMANOWSKA, U.; MATERSKA, M.; ZIELIŃSKA, E. Antioxidant activity of protein hydrolysates from raw heat-treated yellow string beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria**, v. 13, n. 4, p. 385–391, 2014.

KHUWIJITJARU, P.; NUALCHAN, P.; ADACHI, S. Foaming and Emulsifying Properties of Rice Bran Extracts Obtained by Subcritical Water Treatment. **Silpakorn University Science and Technology Journal**, v. 1, n. 1, p. 7–12, 2007.

KIM, H. S. et al. Production of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Hydrolysates from Egg Albumen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 9, p. 1369–1373, 2003.

KIVIMÄKI, A. S. et al. Lingonberry juice improves endothelium-dependent vasodilatation of mesenteric arteries in spontaneously hypertensive rats in a long-term intervention. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 267–274, 2011.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945–960, 2006.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 131–139, 2000.

LACERDA, D. B. C. L.; SOARES JÚNIOR, M. S.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, M. V. L.; SILVA-LOBO, V. L.; CAMPOS, M. R. H.; SIQUEIRA, B. S. Qualidade De Farelos De Arroz Cru, Extrusado E Parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 521–530, 2010.

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

LAKKAKULA, N. R.; LIMA, M.; WALKER, T. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 157–161, 2004.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 21–33, 2004.

LEMOS, N. B.; ANGELI, J. K.; FARIA, T. O.; RIBEIRO-JR., R. F.; VASSALO, D. V.; PADILHA, A. S.; STEFANON, I. Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction , Decreases Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 1–13, 2012.

LI, G.; QU, M.; WAN, J.; YOU, J. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. Suppl 1, p. 275–280, 2007.

LI, G.-H. 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.

LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Revista de Fitoterapia**, v. 88, p. 1660–1666, 2008.

MACHADO L. D. B.; MATOS, J. R. **Análise térmica diferencial e calorimetria diferencial de varredura**. In: CANEVAROLO JUNIOR SV (Ed.). Técnicas de Caracterização de Polímeros. Artliber, São Paulo, Brasil, 2004.

MALIWAL, B. P. In vitro methods to assess the nutritive value of leaf protein concentrate. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 31, p. 315–319, 1983.

MANSO, M. A.; MIGUEL, M.; EVEN, J.; HERNÁNDEZ, R.; ALEIXANDRE, A.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 109, p. 361–367, 2008.

MARAGNO, V. P.; KUHN, R. C. Estabilidade do farelo de arroz sob diferentes tratamentos: micro-ondas, peletização e desengorduramento. **UNOPAR Ciências Biológicas da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 47–53, 2013.

MARTINS, V. G. **Obtenção de um hidrogel proveniente de proteínas da corvina ( *Micropogonias furnieri* ) e solubilização das proteínas fibrosas residuais**. 2009, 208 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B. **Análise térmica – termogravimetria**. In: CANEVAROLO JUNIOR., S.V., (Ed.). Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber, 2004. p.209-228.

MATURANA, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; SPRITZER, P. M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics**, v. 62, n.1, p. 77–86, 2007.

MAYNARD, L.A.; J.K. LOOSLI. **Animal Nutrition**, 6th edition, p: 613. McGraw Hill, New York, 1969.

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 21, n. 1-4, p. 55–61, 2004.

MERZ, M.; EISELE, T.; BERENDS, P.; APPEL, D.; RABE, S.; BLANK, I.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: Automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5682–5693, 2015.

MICHEL; VANHOUTTE, V.; AND P. M. Endothelial dysfunction : a multifaceted disorder. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, p. H985–H1002, 2006.

MIGUEL, M. **Actividad antihipertensiva y antioxidante de péptidos derivados de proteínas de huevo**. 2004, 189 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2004.

MIGUEL, M.; MANSO, A. M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; RAMOS, M. Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. **Europe Food Research and Technology**, v. 221, p. 542–546, 2005.

MIGUEL, M.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M.; ALEIXANDRE, A.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 104, p. 163–168, 2007a.

MIGUEL, M.; MANSO, M. A.; LOEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vascular effects, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10615–10621, 2007b.

MIGUEL, M.; MANSO, M. A.; LOEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vascular effects and antihypertensive properties of k-casein macropeptide. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1473–1477, 2007c.

MIGUEL, M.; ALVAREZ, Y.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. **Regulatory Peptides**, v. 140, p. 131–135, 2007d.

MIGUEL, M.; MANSO, M. A.; MARTÍN-, P. J.; ALEIXANDRE, A.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Angiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long-term intake of hydrolysed egg white. **Molecular Nutrition of Food Research**, v. 51, p. 555–563, 2007e.

MIGUEL, M.; CONTRERAS, M. M.; RECIO, I.; ALEIXANDRE, A. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 112, p. 211–214, 2009.

MIGUEL, M. GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; RECIO, I.; ALEIXANDRE, A. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Nutrition of Food Research**, v. 54, p. 1422–1427, 2010.

MOHAMED, T. K.; ZHU, K.; ISSOUFOU, A.; FATMATA, T.; ZHOU, H. Functionality, in vitro digestibility and physicochemical properties of two varieties of defatted foxtail millet protein concentrates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 12, p. 5224–5238, 2009.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171–182, 2008.

MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 447–456, 2006.

MUGUERZA, B.; RAMOS, M.; SÁNCHEZ, E.; MANSO, M. A.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A.; DELGADO, M. A.; RECIO, I. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 61–69, 2006.

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

NATESH, R.; SCHWAGER, S. L. U.; STURROCK, E. D. Crystal structure of the human enzyme – lisinopril complex. **Nature**, v. 421, p. 551–554, 2003.

NAVES, L. D. P.; CORRÊA, A. D.; MARIA, C.; ABREU, P. Nutrientes e propriedades funcionais em sementes de abóbora ( *Cucurbita maxima* ) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 185–190, 2010.

NIELSEN, K. C.; OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. **Brain Research**, v. 27, n. 1, p. 33–42, 1971.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 642–646, 2001.

NIH. National Heart, Lung and Blood Institute. Description of High Blood Pressure. 2015. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hbp>. Acesso em: 20/03/2016.

NKOSI, C. Z.; OPOKU, A. R.; TERBLANCHE, S. E. Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in low-protein fed rats. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 341–345, 2005.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 1–27, 2009.

OGNIBENE, D. T. ; CARVALHO, L. C. R. M.; COSTA, C. A.; ROCHA, A. P. M.; MOURA, R. S. Role of renin – angiotensin system and oxidative status on the maternal cardiovascular regulation in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 25, n. 4, p. 498–504, 2012.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282–293, 1963.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

OYAIZU, M. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japonise Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F. TERÁN, C. L.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 742–748, 2006.

PASTRE, I. A.; PLICAS, L. M. A.; CUSTÓDIO, J. V.; AGOSTINHO, S. M. L. Reações ácido-base: concenito, representação e generalização a partir das energias envolvidas nas transformações. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2072–2075, 2012.

PEÇAHA, F. M. **A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas de oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxigenase**. 2009, 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2009.

PEÇANHA, A. G. W.; DE DOUTORADO, T.; FISIOLÓGICAS, C. **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos**. 2008, 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2008.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.

- PERASA, L. A. **Efeito da apocina na hipertensão, disfunção endotelial e hipertrofia ventricular esquerda em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)**. 2013, 426 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São Paulo, 2013.
- PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. FARELO DE ARROZ: Características, Benefícios à Saúde e Aplicações. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 29–40, 2008.
- PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306–1314, 2006.
- PIOTROWICZ, I. B. B.; MELLADO, M. M. S. Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1203–1211, 2015.
- PRIPP, A. H.; ISAKSSON, T.; STEPANIAK, L.; SORHAUG, T.; ARDÖ, Y. Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 484–494, 2005.
- PUCHALSKA, P.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. **Food Chemistry**, v. 148, p. 147–154, 2014.
- PUDDU, P.; PUDDU, G. M.; CRAVERO, E.; ROSATI, M.; MUSCARI, A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. **Blood Press**, v. 17, n. 2, p. 70–77, 2008.
- QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1690–1698, 2008.
- QUIRÓS, A.; CHICHÓN, R.; RECIO, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1734–1739, 2007.
- QUIRÓS, A. CONTRERAS, M. M.; RAMOS, M.; AMIGO, L.; RECIO, I. Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of B-casein-peptides with antihypertensive properties. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1848–1853, 2009.
- RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, n. 2, p. 175–182, 2005.
- RIMÓN, M. G. **Hidrolizados de proteínas de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al síndrome metabólico y sus complicaciones**. 2013, 233 f. Tese (Instituto de Investigación en Ciencia de la Alimentación) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2013.
- RIZZETTI, D. A. ; TORRES, G. D.; ESCOBAR, A. G.; PEÇANHA, F. M.; SANTOS, F. W.; PUNTEL, R. L.; ALONSO, J.; BRIONES, A. M.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V.; WIGGERS, G. A. Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2013.

ROVER JR., L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistemas antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112–119, 2001.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 432–442, 2010.

SAUNDERS, R. M. The properties of rice bran as a foodstuff. **Cereal Foods World**, v. 35, n. 7, p. 632–636, 1990

SENTANDREU, M. Á.; TOLDRÁ, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 546–554, 2006.

SGARBIERI, Valdemiro C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. Livraria Varela – São Paulo, 1996.

SHAH, A.M.; CHANNON, K.M. Free radicals and redox signaling in cardiovascular disease. **Heart**, v. 90, p. 486–487, 2004.

SIGMA-ALDRICH. **To standardize a procedure for the enzymatic assay of Protease using Casein as a substrate at Sigma-Aldrich St. Louis**. v. 1, p. 5-8, 2011. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/life-science-video/universal-protease.html>. Acesso em: 20/02/2016.

SILVA, P. M. **Isolado proteico de farelo de arroz: obtenção, propriedades funcionais e aplicação**. 2012, 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

SILVA, R. O. DE P.; LOPES, A. D. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas : interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, n. 2, p. 116–122, 2008.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial , radicais livres e envelhecimento. **Rev Bras Geriatria Gerontologia**, v. 14, n. 1, p. 441–451, 2011.

ŠLIŽYTE, R. et al. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1415–1424, 2005.

SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 447–453, 2003.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S. A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 159–165, 2007.

KUMAR, K. S.; GANESAN, K.; SELVARAJ, K.; RAO, P. V. Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (*Doty*) Doty - An edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 153, p. 353–360, 2014.

TANG, C. H.; PENG, J.; ZHEN, W.; CHEN, Z. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 672–678, 2009.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 152–157, 2003.

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMINGUÉZ-MAGAÑA, M. A.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A.. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 6, n. 2, p. 158–168, 2008.

TOUYZ, R. M. Redox Signaling in Hypertension What Is the Clinical Significance? **Hypertension Highlights**, v. 44, p. 248–253, 2004.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Controversies in Cardiovascular Research. **Circulation Research**, v. 48, n. 3, p. 309–319, 1981.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

URAIPOG, C.; ZHAO, J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro  $\alpha$ -amylase, B-glucosidase and ACE-inhibition activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1101–1110, 2015.

VAN DER VEN, C.; GRUPPEN, H.; BONT, D. B. A.; VORAGEN, A. G. J. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2938–2946, 2002.

VERMA, S.; BUCHANAN, M. R.; ANDERSON, T. J. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2054–2059, 2003.

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

WAN MOHTAR, W. A. A. Q. I.; HAMID, A. A.; ABD-AZIZ, S.; MUHAMAD, S. K. S.; SAARI, N. Preparation of bioactive peptides with high angiotensin converting enzyme inhibitory activity from winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.] seed. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3658–3668, 2014.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 411–416, 1999.

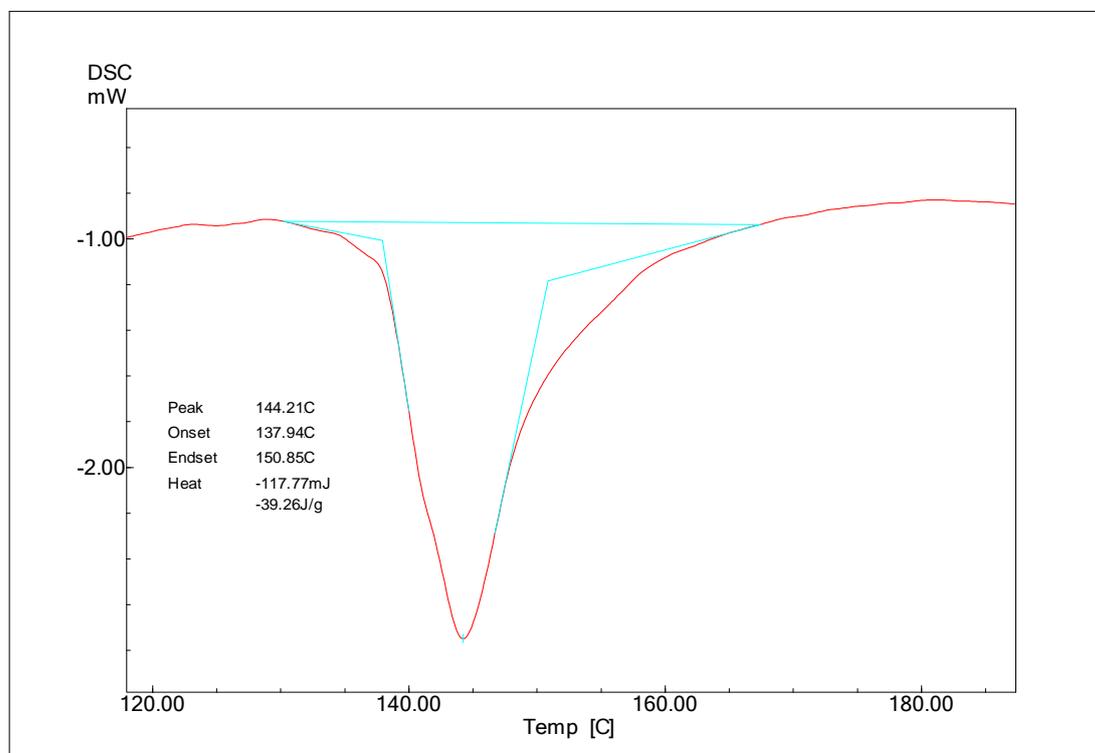
WANG, W.; GONZALEZ DE MEJIA, E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 4, p. 63–78, 2005.

- WATFORD, M.; WU, G. Protein 1. **An International Review Journal**, v. 2, p. 62–63, 2011.
- WATTANASIRITHAM, L.; THEERAKULKAIT, C.; WICKRAMASEKARA, S.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, v. 192, p. 156–162, 2016.
- WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p. 949–957, 2003.
- WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, v. 35, p. 367–375, 2002.
- XIA, N.; WANG, J.; YANG, X.; YIN, S.; QI, J.; HU, L.; ZHOU, X. Preparation and characterization of protein from heat-stabilized rice bran using hydrothermal cooking combined with amylase pretreatment. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 1, p. 95–101, 2012.
- XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 370–376, 2008.
- YANG, R.; ZOU, Y.; YU, N.; GU, Z. Accumulation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from wheat germ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3598–3605, 2011.
- YUN, J. H.; KWON, I. K.; LOHAKARE, J. D.; CHOI, J. Y.; YONG, J. S.; ZHENG, J.; CHO, W. T.; CHAE, B. J. Comparative efficacy of plant and animal protein sources on the growth performance, nutrient digestibility, morphology and caecal microbiology of early-weaned pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1285–1293, 2005.
- ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus Punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739–1743, 2009.
- ZHANG, H. J.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X. N. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 359–363, 2012.
- ZHANG, J.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X.; WANG, X.; YAO, H. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 226–234, 2010.
- ZHANG, H. J.; WANG, J.; ZHANG, B. H.; ZHANG, H. Antioxidant activities of the fractionated protein hydrolysates from heat stable defatted rice bran. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1330–1336, 2014.
- ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; XIE, J.; PENG, H.; SUN, W.; ZHOU, Q. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. **Journal of Cereal Science**, v. 56, p. 568–575, 2012.

ZHU, L.; JIE, C.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.

## APÊNDICES

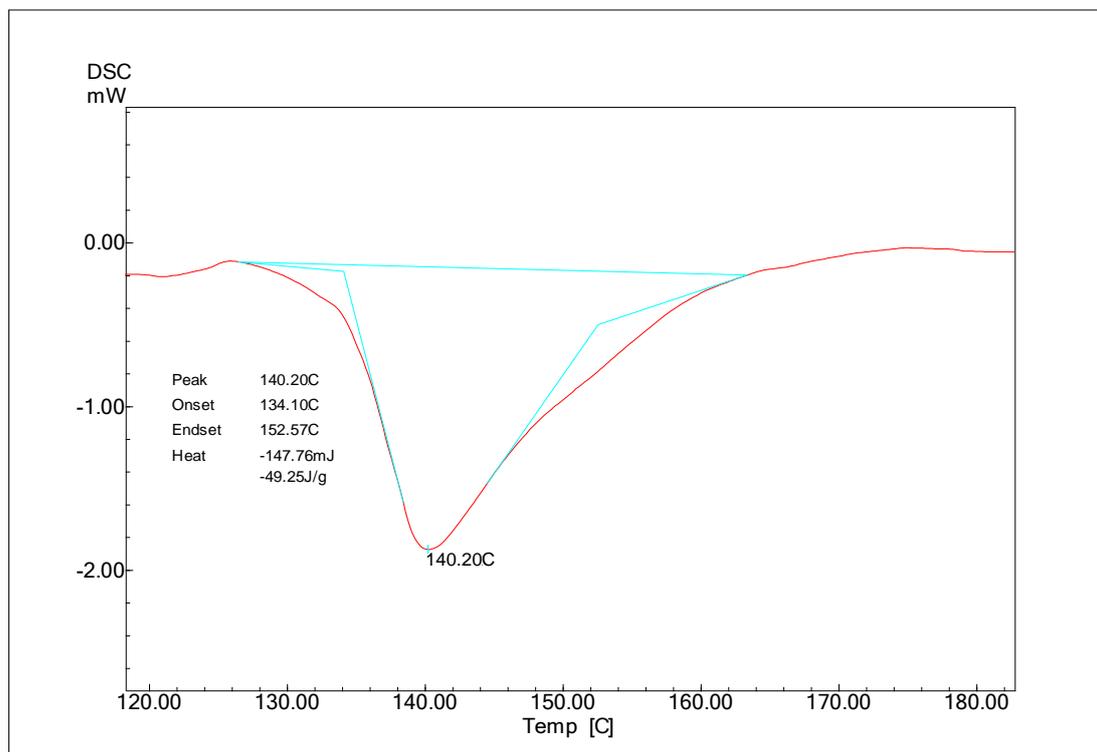
**Figura AP 1-** Curva de DSC do CPFAD-1 com os respectivos valores de temperatura de início (Onset), de pico (Peak) e final (End) e a variação de entalpia (Heat) de desnaturação.



CPFA

D-1: Concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado no laboratório.

**Figura AP 2-** Curva de DSC do CPFAD-2 com os respectivos valores de temperatura de início (Onset), de pico (Peak) e final (End) e a variação de entalpia (Heat) de desnaturação.



CPFAD-2: Concentrado proteico de farelo de arroz desengordurado na indústria.

**Tabela AP 1-** Cinética de hidrólise (tempo vs. volume gasto de NaOH) dos concentrados proteicos de farelo de arroz com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

Tempo (min)	HPFAD-1A	HPFAD-2A	HPFAD-1F	HPFAD-2F
0	0	0	0	0
5	0,7	1,1	0,7	1,2
10	1,5	2,3	1,1	1,7
15	1,9	2,9	1,5	2,0
20	2,4	3,6	1,7	2,6
25	2,6	4,2	1,9	3,0
30	2,9	4,7	2,0	3,2
40	3,5	5,4	2,2	3,6
50	4,0	6,2	2,4	4,0
60	4,5	6,7	2,6	4,2
70	4,9	7,1	2,9	4,5
80	5,3	7,6	3,1	4,7
90	5,8	7,9	3,2	4,8
100	6,2	8,3	3,3	5,0
110	6,4	8,6	3,4	5,3
120	6,6	8,8	3,4	5,3
130	6,8	9,1	3,5	5,3
140	7,0	9,4	3,6	5,5
150	7,2	9,6	3,6	5,6
160	7,4	9,8	3,7	5,6
170	7,7	10,0	3,7	5,7
180	8,0	10,2	3,8	5,7
190	8,1	10,3	3,8	5,8
200	8,1	10,5	3,8	5,8
210	8,2	10,7	3,9	5,9
220	8,3	10,8	3,9	5,9
230	8,4	10,9	3,9	5,9
240	8,5	11,0	3,9	5,9
250	8,5	11,2	4,1	5,9
260	8,6	11,3	4,1	5,9
270	8,7	11,4	4,2	5,9
280	8,8	11,6	4,2	5,9
290	8,9	11,7	4,2	5,9
300	8,9	11,8	4,2	5,9
310	9,1	11,9	4,2	5,9
320	9,1	12,0	4,2	5,9

HPFAD-1A: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-1 com a enzima Alcalase; HPFAD-2A: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-2 com a enzima Alcalase; HPFAD-1F: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-2F: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme;

**Tabela AP 1-** Cinética de hidrólise (tempo vs. volume gasto de NaOH) dos concentrados proteicos de farelo de arroz com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

Tempo (min)	HPFAD-1A	HPFAD-2A	HPFAD-1F	HPFAD-2F
330	9,2	12,1	4,2	5,9
340	9,3	12,2	4,2	5,9
350	9,5	12,2	4,2	5,9
360	9,5	12,3	4,2	5,9
370	9,7	12,4	4,2	5,9
380	9,8	12,5	4,2	5,9
390	9,8	12,5	4,2	5,9
400	9,8	12,6	4,2	5,9
410	9,8	12,7	4,2	5,9
420	9,9	12,7	4,2	5,9
430	9,9	12,8	4,2	5,9
440	10,0	12,8	4,2	5,9
450	10,1	12,9	4,2	5,9
460	10,1	13,0	4,2	5,9
470	10,2	13,0	4,2	5,9
480	10,3	13,1	4,2	5,9
490	10,3	13,2	4,2	5,9
500	10,3	13,2	4,2	5,9
510	10,3	13,2	4,2	5,9
520	10,3	13,3	4,2	5,9
530	10,3	13,3	4,2	5,9
540	10,4	13,4	4,2	5,9
550	10,4	13,4	4,2	5,9
560	10,4	13,4	4,2	5,9
570	10,4	13,4	4,2	5,9
580	10,4	13,4	4,2	5,9
590	10,4	13,4	4,2	5,9
600	10,4	13,4	4,2	5,9

HPFAD-1A: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-1 com a enzima Alcalase; HPFAD-2A: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-2 com a enzima Alcalase; HPFAD-1F: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-1 com a enzima Flavourzyme; HPFAD-2F: Hidrolisado proteico do concentrado CPFAD-2 com a enzima Flavourzyme;

**Tabela AP 2-** Efeito inibidor dos peptídeos menores de 3 kDa provenientes dos concentrados proteicos de farelo de arroz com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

Amostra	% IECA
HPFAD 1A<3	85,66 <sup>a</sup> ±5,50
HPFAD-2A<3	75,02 <sup>a</sup> ±4,48
HPFAD-1F<3	37,51 <sup>b</sup> ±6,71
HPFAD-2F<3	33,69 <sup>b</sup> ±2,80

IECA: inibição da enzima conversora da angiotensina; HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média ± desvio padrão de 3 determinações. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

**Tabela AP 3-** Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas depois da administração oral dos diferentes peptídeos menores de 3 kDa.

Tempo (horas)	PAS (mm Hg)					
	Água	Captopril (50 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (100 mg/kg)	HPFAD-2A<3 (100 mg/kg)	HPFAD-1F<3 (100 mg/kg)	HPFAD-2F<3 (100 mg/kg)
0	201,0±6,7	201,3±3,2	199,8±12,4	202,0±4,0	214,8±5,8	204,0±6,9
2	190,5±5,1	172,8±3,4	143,5 <sup>#,‡</sup> ±10,3	184,3±4,8	183,0±11,6	175,0±9,5
4	186,8 <sup>*</sup> ±3,6	154,5 <sup>#,‡</sup> ±8,7	159,8±4,2	165,0±14,6	159,8 <sup>#,‡</sup> ±9,3	170,3±12,2
6	198,6 <sup>*</sup> ±5,8	134,3 <sup>#,‡</sup> ±9,0	141,5 <sup>#,‡</sup> ±8,8	162,5 <sup>#</sup> ±5,9	170,3 <sup>#</sup> ±19,0	168,3 <sup>#,‡</sup> ±3,11
8	192,4 <sup>*</sup> ±3,5	121,4 <sup>#,‡</sup> ±11,7	130,3 <sup>#,‡</sup> ±8,8	163,5 <sup>*,#</sup> ±9,3	175,5 <sup>*,#</sup> ±9,8	187,8 <sup>*</sup> ±3,1
24	189,8±4,9	185,0±3,7	170,0 <sup>‡</sup> ±11,1	191,5±7,9	202,8±3,9	206,0±4,4

HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2F<3: HPFAD-2F de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média ± erro padrão de 4-8 ratos. <sup>\*</sup>Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle positivo (Captopril); <sup>#</sup>Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle negativo (Água). <sup>‡</sup> Sinais iguais na mesma coluna indicam diferença significativa dos tempos de ação das substâncias em relação ao tempo zero. (p<0,05).

**Tabela AP 4-** Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a administração oral de diferentes doses dos peptídeos presentes em HPFAD-1A<3.

Tempo (horas)	PAS (mm Hg)						
	Água	Captopril (50 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (80 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (40 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (20 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (10 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (1 mg/kg)
0	207,7±4,2	212,0±6,3	218,1±2,7	212,9±4,4	219,8±3,6	221,0±1,9	212,0±3,5
2	210,8* ±3,7	196,1# ±5,1	201,9# ±4,8	197,4# ±3,9	214,0* ±5,4	210,9* ±4,3	211,5* ±2,9
4	209,1* ±3,8	181,9#‡ ±3,3	195,1#‡ ±4,1	197,4# ±5,8	207,1* ±4,5	210,1* ±3,3	207,3* ±3,6
6	204,3* ±2,8	175,5#‡ ±5,2	197,9# ±4,8	191,1# ±4,8	197,9# ±6,2	205,5±2,9	202,8* ±4,0
8	202,8* ±2,7	179,6#‡ ±5,2	192,3#‡ ±3,0	187,5#‡ ±6,1	193,4#‡ ±6,1	195,3#‡ ±5,5	196,1±7,4
24	205,4±4,0	205,3±6,8	208,0±5,5	205,5±3,8	206,8±5,7	210,9±3,5	207,1±4,2
48	206,6±3,4	211,8±7,6	215,6±5,9	212,1±4,9	216,6±3,7	217,8±1,9	211,3±3,5

HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média ± erro padrão de 8-12 ratos. \*Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle positivo (Captopril); #Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle negativo (Água); ‡ Sinais iguais na mesma coluna indicam diferença significativa dos tempos de ação das substâncias em relação ao tempo zero. (p<0,05).

**Tabela AP 5-** Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a administração oral dos diferentes peptídeos menores de 3 kDa.

Tempo (horas)	PAS (mm Hg)				
	Água	Captopril (50 mg/kg)	HPFAD-1A<3 (80 mg/kg)	HPFAD-2A<3 (80 mg/kg)	HPFAD-1F<3 (80 mg/kg)
0	207,7±4,2	212,0±6,3	218,1±2,7	212,9±4,4	219,8±3,6
2	210,8*±3,7	196,1 <sup>#</sup> ±5,1	201,9 <sup>#</sup> ±4,8	197,4±3,9	214,0±5,4
4	209,1*±3,8	181,9 <sup>#,‡</sup> ±3,3	195,1 <sup>#,‡</sup> ±4,1	197,4*±5,8	207,1*±4,5
6	204,3*±2,8	175,5 <sup>#,‡</sup> ±5,2	197,9 <sup>#</sup> ±4,8	191,1*±4,8	197,9*±6,2
8	202,8*±2,7	179,6 <sup>#,‡</sup> ±5,2	192,3 <sup>#,‡</sup> ±3,0	187,5*±6,1	193,4*±6,1
24	205,4±4,0	205,3±6,8	208,0±5,5	205,5±3,8	206,8±5,7
48	206,6±3,4	211,8±7,6	215,6±5,9	214,4±4,7	209,6±5,0

HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-2A<3: HPFAD-2A de massa molecular menor que 3 kDa; HPFAD-1F<3: HPFAD-1F de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média ± erro padrão de 8-12 ratos. \*Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle positivo (Captopril); <sup>#</sup>Diferença significativa dos tratamentos em comparação com o controle negativo (Água); <sup>‡</sup> Sinais iguais na mesma coluna indicam diferença significativa dos tempos de ação das substâncias em relação ao tempo zero. (p<0,05).

**Tabela AP 6-** Pressão arterial sistólica (PAS) obtida de ratos Wistar-Kyoto (WKY) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a administração oral dos peptídeos presentes em HPFAD-1A<3.

Tempo (horas)	PAS (mm Hg)	
	Água	HPFAD-1A<3 (80 mg/kg)
0	140,8±3,3	138,5±5,0
2	138,7±4,2	137,2±4,0
4	136,7±1,0	135,8±3,3
6	138,7±4,8	137,3±2,8
8	136,7±2,9	137±4,8
24	138,8±3,5	135,7±3,5

HPFAD-1A<3: HPFAD-1A de massa molecular menor que 3 kDa. Os valores representam a média ± erro padrão de 6 ratos.

## ANEXOS

**Figura A 1-** Ficha técnica de alimento para ratos, ramister e camundongo (A04/A04C/R04).



## A04/A04C/R04

FICHA TÉCNICA ALIMENTO

### • DEFINICIÓN

Alimentos ratas, ratones, hámsteres cuidado

### • OBJETIVO PRODUCTO

Alimento roedor destinado a los animales adultos y en mantenimiento, en el marco de los protocolos experimentales.

**Periodo de distribución:** para distribuirse desde el destete y a los roedores adultos.

**Cantidad consumida diaria:** ratas de 15 a 25 g, ratones de 5 a 10 g.

**Modo de distribución:** alimentación a voluntad o racionamiento según los protocolos experimentales

### • PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

Granulado de 15 mm de diámetro (posibilidad de modificar a petición suya)

### • CONDICIÓN DE MANTENIMIENTO

Variante del alimento en función del estado del animalario

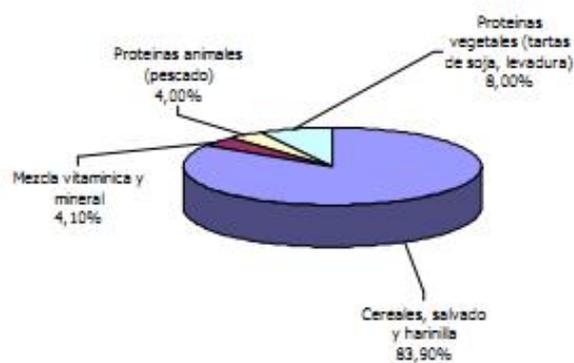
Alimento Envasado	Embalaje	Ficha analítica	Nivel de irradiación	Estado de los animales	
A04	10 Kg	Bolsa de papel	No	Ninguno	Convencional
A04C	10 Kg	Bolsa de papel	Sí	Ninguno	Convencional
A04-10	10 Kg	Bolsa de papel	No	10 Kilograys	EOPS/ IOPS/SPF Inmunodeprimidos
A04C-10	10 Kg	Bolsa de papel	Sí	10 Kilograys	EOPS/ IOPS/SPF Inmunodeprimidos
R04-10	10 Kg	Al vacío	No	10 Kilograys	EOPS/ IOPS/SPF Inmunodeprimidos
R04-25	10 Kg	Al vacío	No	25 Kilograys	EOPS/ IOPS/SPF Inmunodeprimidos
R04-40	10 * 1 Kg	Al vacío	No	40 Kilograys	Axénicos / Gnotoxénicos

A04/A04C/R04

FICHA TÉCNICA ALIMENTO

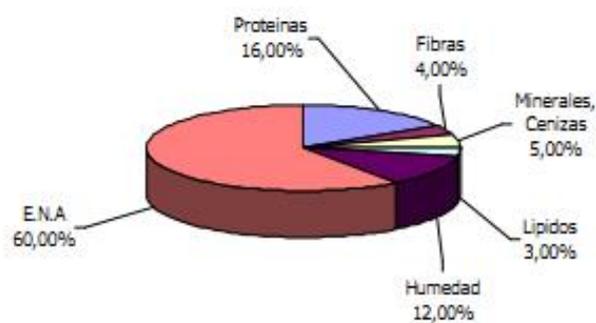
---

#### • COMPOSICIÓN CENTESIMAL



#### • COMPOSICIÓN NUTRITIVA

Aportación calorica (kcal/kg) 2 900



*Los valores se proporcionan a título indicativo, se trata de un promedio*

♦ COMPOSICIÓN NUTRITIVA EXHAUSTIVA (valor medio)

*Composición de los lípidos grasos esenciales limitadores (\*)*

**APORTACION DE AMINOACIDOS**  
Calculada / kg

9 800 mg	Arginina
2 300 mg	Citina
7 700 mg	Lisina
2 800 mg	Metionina
1 900 mg	Triptofano
8 100 mg	Glicina

*Composición de los lípidos grasos esenciales (\*)*

**APPORT EN ACIDES GRAS**

Calculada / kg

4 000 mg	Acido palmitico
600 mg	Acido palmitoléico
Trazas	Acido esteralco
6 400 mg	Acido oleico
12 400 mg	Acido linoleico
90 mg	Acido linoléico

*Composición mineral (origen)*

Minerales calculados / kg

		Nat.val.*	CMV val.	TOTAL
<b>P</b>	mg	5 900	-	5 900
<b>Ca</b>	mg	3 300	5 000	8 300
<b>Na</b>	mg	900	1 600	2 500
<b>K</b>	mg	6 700	-	6 700
<b>Mg</b>	mg	1 900	100	2 000
<b>Mn</b>	mg	20	40	60
<b>Fe</b>	mg	90	150	240
<b>Cu</b>	mg	Trazas	15	15
<b>Zn</b>	mg	40	45	85
<b>Co</b>	mg	Trazas	1,5	1,5
<b>I</b>	mg	0,3		0,3

Composición vitamínica (origen)

Vitaminas calculadas / kg

		Nat.val.*	CMV val.	TOTAL
<b>Vitam. A</b>	UI	Trazas	7 500	7500
<b>Vitam. D3</b>	UI	Trazas	1 000	1000
<b>Vitam. B1</b>	mg	6	1	7
<b>Vitam. B2</b>	mg	2	4,5	6,5
<b>Vitam. B3</b>	mg	10	6,5	16,5
<b>Vitam. B6</b>	mg	1,3	1,3	2,6
<b>Vitam. B12</b>	mg	0,01	0,01	0,02
<b>Vitam. E</b>	mg	15	15	30
<b>Vitam. K3</b>	mg	0,25	2,25	2,5
<b>Vitam. PP</b>	mg	60	15	75
<b>Ac. Fólico</b>	mg	0,5		0,5
<b>Biotina</b>	mg	0,04		0,04
<b>Collina</b>	mg	1200	400	1600

(\*) los valores indicados se han obtenido de tablas alimentarias internacionales. Se transmiten a título informativo y no tienen valor contractual. Se someten a variaciones relativas a las condiciones de cultura, almacenamiento y métodos analíticos.

## ♦ FICHA CONTROL PROMEDIO

	Promedio	Desviación típica	Límites
Cantidad media por lote (en toneladas)	22	13	
Control de la composición centesimal	Nat. val. *		
<b>TECNOLOGIA DE LOS PELLETS</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Límites</b>
Diametro (en mm)	16,43	0,24	(15,5 ã 17,0)
Resistencia al aplastamiento (en kg/cm <sup>2</sup> )	22,7	3,8	(15 ã 30)
Resistencia a la abrasión (en %)	97,3	0,6	(> 97)
Masa específica (en g/l)	645	36	
Peso (en g)	5,319	0,455	
Longitud (en mm)	22,64	1,38	(18,0 ã 26,0)
Longitud < Diametro (en %)	0,4	0,9	(< 2)
Numero de pellets calientes por kg (/kg)	0	0	(< 1)
<b>CONTROL DE LA CALIDAD NUTRITIVA</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Límites</b>
Testigo incorporacion mezcla mineral (Na)	Positivo		
Testigo incorporacion premezcla oligoelementos (Mn y Cu)	Positivo		
Testigo incorporacion premezcla vitaminas	Positivo		
Agua (en %)	11,9	0,9	(9 ã 14)
Proteinas (en %)	16,1	0,6	(14,5 ã 18,0)
Lipidos (en %)	3,1	0,3	(1,7 ã 3,7)
Glucidos E.N.A (en %)	60	1,3	(57,0 ã 63,0)
Parte de almidon (en %)	45,8	3,6	(35,0 ã 53,0)
Parte de azucares totales celulosa WEENDE (en %)	2	0,6	
Hemicelulosa (en %)	3,9	0,5	(3,0 ã 5,5)
Celulosa verdadera (en %)			
Lignina (en %)			
Minerales totales (en %)	5,1	0,4	(4,0 ã 6,0)
Parte de calcio (en mg/kg)	8400	800	(6000 ã 10000)
Parte de fosforo (en mg/kg)	5700	400	(4500 ã 7000)
Parte de sodio (en mg/kg)	2500	300	(1500 ã 3500)
Parte de potasio (en mg/kg)	6400	600	(5500 ã 8500)
Parte de manganeso (en mg/kg)	70	9	(40 ã 100)
Parte de cobre (en mg/kg)	17	3	(10 ã 35)
Vitamina A (en UI/kg)	6600	1100	(4000 ã 11000)
Vitamina C (en mg/kg)			
Vitamina D3 (en UI/kg)	900	400	(<= 3000)
Vitamina E (en mg/kg)	30	10	
<b>CONTROL DE LOS CONTAMINANTES BACTERIOLOGICOS</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Límites</b>
<b>BACTERIOLOGICOS</b>			
Micoorganismos aerobicos 30°C (/g)	1700	4800	(< 100000)
Mohos y levaduras (/g)	< 10		(< 1000)
Coliformes 30°C (/g)	0	1	(<5)
Coliformes termotolerantes (/g)	0	0	(0)
Anaerobios sulfito-reductores 46°C (/g)	< 10		(< 100)
Salmonelas (/25g)	0		(0)

A04/A04C/R04

FICHA TÉCNICA ALIMENTO

MICOTOXICOS (en µg / kg)	Promedio	Desviación típica	Limites
Aflatoxinas	< 1		(< 5)
Riesgo micotóxico	Negativo		
METALES PESADOS	Promedio	Desviación típica	Limites
Plomo (en µg/kg)	200	150	(< 1500)
Mercurio (en µg/kg)	21	11	(< 100)
Arsénico (en µg/kg)	70	100	(< 1000)
Cadmio (en µg/kg)	51	32	(< 250)
Selenio (en µg/kg)	160	70	(< 600)
DERIVADOS NITROSOS	Promedio	Desviación típica	Limites
NO <sub>2</sub> (en mg/kg)	2,1	4,7	Σ (< 500)
NO <sub>3</sub> (en mg/kg)	25,6	28,6	
NDMA (en µg/kg)	0,84	0,36	(< 10)
NDEA (en µg/kg)	< 0,2		(< 10)
NDPA (en µg/kg)	< 0,3		(< 10)
NDBA (en µg/kg)	< 0,3		(< 10)
NPIP (en µg/kg)	< 0,3		(< 10)
NPYR (en µg/kg)	< 0,5		(< 10)
NMOR (en µg/kg)	< 0,6		(< 10)
PESTICIDAS ORGANOCLORADOS (en µg/kg) (Total < 200)	Promedio	Desviación típica	Limites
Lindano	2	6	(< 100)
a HCH	< 1		(< 20)
b HCH	< 5		(< 10)
d HCH	< 5		(< 100)
HCB	< 1		(< 10)
PCB	< 50		(< 50)
Aldrin	< 1		(< 10)
Dieldrina	< 1		(< 20)
Endosulfan	< 1		(< 100)
Heptacloro	< 1		Σ (< 50)
Heptacloro Epóxido	< 1		
Endrin	< 1		(< 10)
o,p'DDD	< 5		Σ (< 50)
p,p'DDD	< 5		
o,p'DDE	< 1		
p,p'DDE	< 1		
o,p'DDT	< 5		
p,p'DDT	< 5		

PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS (en µg/kg) (Total < 7000)	Promedio	Desviacion tipica	Limites
Acefato	< 500		(< 5000)
Azinfos-etil	< 50		(< 5000)
Azinfos-metil	< 50		(< 5000)
Bromofos-etil	< 10		(< 5000)
Bromofos-metil	< 20		(< 5000)
Carbofenation-etil	< 50		(< 5000)
Carbofenation-metil	< 20		(< 5000)
Clorfenvinfos	< 10		(< 5000)
Clormefos	< 10		(< 5000)
Clorpirifos-etil	< 15		(< 5000)
Clorpirifos-metil	< 15		(< 1500)
Clortiofos	< 15		(< 5000)
Diazinon	< 15		(< 5000)
Diclofention	< 10		(< 5000)
Diclorvos	< 20		(< 5000)
Dietion	< 10		(< 5000)
Dimefox	< 20		(< 5000)
Dimetoato	< 30		(< 1000)
Dioxation	< 15		(< 5000)
Disulfoton	< 30		(< 5000)
Etoprofos	< 20		(< 5000)
Fenclorfos	< 20		(< 5000)
Fenitrotion	< 15		(< 5000)
Fention	< 30		(< 5000)
Fonofos	< 20		(< 5000)
Formation	< 20		(< 5000)
Heptenofos	< 30		(< 5000)
Iodofenfos	< 25		(< 5000)
Malation	56	54	(< 5000)
Metamidofos	< 15		(< 5000)
Metidation	< 25		(< 5000)
Mevinfos	< 10		(< 5000)
Monocrotofos	< 90		(< 5000)
Naled	< 15		(< 5000)
Oxidemeton-metil	< 400		(< 5000)
Paration-etil	< 20		(< 5000)
Paration-metil	< 20		(< 5000)
Fosalona	< 50		(< 5000)
Fosmet	< 50		(< 5000)
Fosfamidon	< 25		(< 5000)
Profenofos	< 50		(< 5000)
Protoato	< 20		(< 5000)
Piridafention	< 15		(< 5000)
Pirimifos-etil	< 20		(< 5000)
Pirimifos-metil	34	105	(< 2500)
Sulfotep	< 20		(< 5000)
Temefos	< 15		(< 5000)
Tetraclorvinfos	< 30		(< 5000)
Tiometon	< 40		(< 5000)
Triazofos	< 30		(< 5000)
Triclorfon	< 10		(< 5000)
Tricloronato	< 25		(< 5000)
PIRETRINOIDES DE SINTESIS (en µg/kg)			
Deltamethrine	0 -- 3		