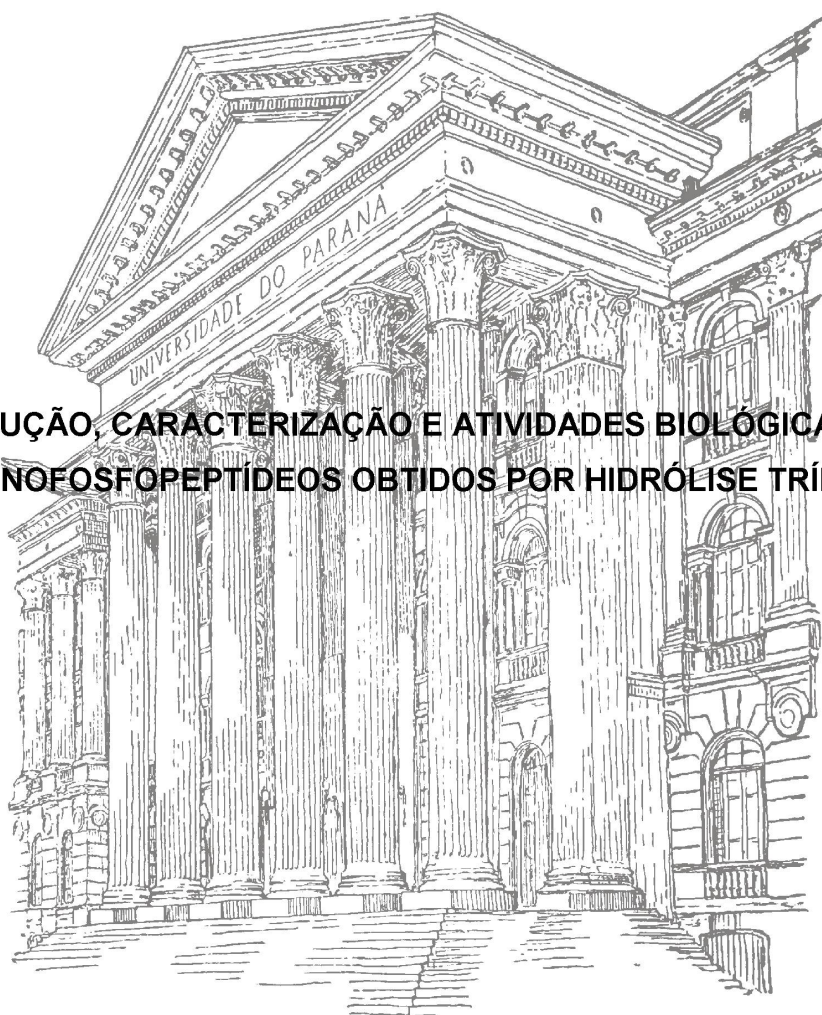


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS REGINA MEZZOMO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE TRÍPTICA**



**CURITIBA
2013**

THAIS REGINA MEZZOMO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE TRÍPTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção ao grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, do Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Almeriane Maria Weffort-Santos

Co-Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Claudia Carneiro Hecke Krüger

**CURITIBA
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional

EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thais Regina Mezzomo

Titulo: *"Produção, caracterização e atividades biológicas de caseinofosfopeptídeos obtidos por hidrólise triptica"*

PARECER

A Banca de Defesa, reunida nesta data nas dependências do Setor de Ciências da Saúde, Campus Botânico, da Universidade Federal do Paraná, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. Almeriane Maria Weffort-Santos orientadora, Profa. Dra. Lys Mary Bileski Cândido PPGSAN/UFPR e Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza DFAR/UFPR, após análise da dissertação e arguição com a mestrande, a banca aprovou a referida dissertação como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Segurança Alimentar e Nutricional, no Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional.


Profa. Dra. Almeriane Maria Weffort-Santos


Profa. Dra. Lys Mary Bileski Cândido


Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Nutrição pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC) em 2006, especializou-se em Terapia Nutricional com Treinamento em Serviço pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), e em Nutrição Clínica Funcional e Fitoterapia pela PUC. Foi nutricionista coordenadora do Serviço de Nutrição da Policlínica Pato Branco, vice-presidente da Comissão de Qualidade do mesmo hospital, atuou em consultório e também como professora supervisora de estágio em Nutrição Clínica (Faculdade de Pato Branco-FADEP) concomitantemente. Desligou-se das atividades para dedicar-se ao mestrado em Segurança Alimentar e Nutricional, na UFPR, onde desenvolveu uma pesquisa sobre produção, caracterização e atividades biológicas de caseinofosfopeptídeos *in vitro*, cujos resultados estão contidos nesta dissertação.

Dedico este trabalho

À Deus, por ser tudo em minha vida;

À memória de meu avô, Angelo Mezzomo, que sempre me apoiou e incentivou a crescer;

Aos meus pais, Claudio e Terezinha, que me proporcionaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, que sonhar e concretizar sonhos só dependem da nossa vontade;

Aos meus irmãos Marcelo e Maira, pelo apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas preciosas;

A CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional pela oportunidade de realização desse mestrado;

A professora Dra. Almeriane M. Weffort Santos, pela dedicação, incentivo e conhecimentos compartilhados;

A professora Dra. Claudia C. H. Krüger, pela co-orientação e conhecimentos compartilhados;

As pessoas que colaboraram como sujeitos de pesquisa e seus familiares;

Aos colegas do programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional e do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio, ajuda e incentivo;

Aos técnicos dos laboratórios de pesquisa, Jair José de Lima, Lindamir Tomzack Túlio, Jaqueline Leobet e Adriana Serenato de Souza, pelo suporte e atenção;

A professora Dra. Sandra Mara W. Barreira e a mestranda Camila Vandresen pela liofilização dos peptídeos;

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo pela oportunidade de realização de espectrometria de massas;

Ao doutorando Cleverson Martins pela ajuda na realização de espectrometria de massas;

Ao Dr. Marcelo Ribani, do TECPAR, pela ajuda na realização de cromatografia líquida de alta eficiência;

A mestranda Daniela Marcondes, pela ajuda na realização de citometria de fluxo;

A professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth, pela ajuda na realização dos ensaios de atividade antimicrobiana;

A amiga mestranda Paula Piekarski, pela ajuda na realização de atividades antioxidantes;

A amiga mestranda Juliana Nadal, pelo apoio e ajuda nas análises estatísticas;

A todos os professores que fizeram parte desse caminho;

Aos meus pais, Claudio e Terezinha, pelo exemplo de amor e força. Pelas oportunidades oferecidas, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida;

Ao meu irmão, Marcelo, que, mesmo de longe, torceu por mim;

A minha irmã, Maira, por todo o suporte e carinho durante as intermináveis horas de estudo;

A todos que não citei, contudo, estavam presentes em minha vida e contribuíram para esta conquista,

Muito obrigada!

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos”.

Albert Einstein

RESUMO

Há grande interesse no estudo da relação entre nutrição e imunidade devido à hipótese de que o consumo de determinados alimentos pode reduzir a susceptibilidade e/ou a progressão de doenças associadas à resposta imunológica. O objetivo desse estudo foi produzir, caracterizar e conhecer as atividades biológicas de caseinofosfopeptídeos (CPP) nas respostas inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. Para tanto, CPP foram produzidos por hidrólise trípica do caseinato de sódio, seguida de precipitação ácida, agregação mineral e precipitação com etanol, sob as condições de 2 e 4 horas de hidrólise, à 37°C e 50°C. Em seguida, foram caracterizados através de avaliação da composição centesimal, Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, Espectometria de Massas e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Posteriormente, leucócitos humanos de indivíduos sadios para os quais os CPP não se mostraram tóxicos foram utilizados nos seguintes ensaios: (a) expressão das integrinas LFA-1, VLA-4 e VLA-5 por citometria de fluxo; (b) quimiotaxia de granulócitos em câmaras de Boyden, (c) atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* em teste de microdiluição em caldo e (d) determinação da capacidade antioxidante, usando os métodos de redução do fosfomolibdênio e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostraram que os CPP obtidos apresentam baixo peso molecular e elevados teores proteico e mineral; quanto ao perfil aminoacídico, apresentam elevada e diferenciada quantidade de ácido glutâmico e serina, conforme o processo de obtenção. Quanto às atividades biológicas, os CPP não influenciaram a expressão de LFA-1. Para VLA-4, entretanto, os CPP 2h/37°C diminuíram significativamente a expressão em linfócitos, CPP 2h/50°C diminuíram significativamente a expressão em granulócitos, e os CPP 4h/37°C e 50°C aumentaram significativamente a expressão da mesma integrina em granulócitos. Em relação à VLA-5, os CPP 4h/37°C e 50°C aumentaram significativamente sua expressão em linfócitos e granulócitos. Os CPP 4h/37°C e 50°C h apresentaram habilidade em promover significativamente a locomoção de granulócitos, em contraste com os CPP 2h/37°C e 50°C, que a inibiram. Todos os hidrolisados apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli* e *S. enteritidis*. Mostraram-se, também, dotados de capacidade antioxidante, a qual foi melhor revelada pelo ensaio do TBARS. Os resultados deste trabalho indicam, pela primeira vez, que CPP derivados de hidrólise trípica podem contribuir para com a resposta inflamatória não específica e, por apresentam atividades antimicrobiana e antioxidante, podem ser úteis na promoção da saúde em situações especiais que envolvem pacientes desnutridos e imunodeprimidos ou com comprometimento gastrointestinal decorrente de inflamações.

PALAVRAS-CHAVE: Caseinofosfopeptídeos. Caseinato de sódio. Inflamação. Moléculas de adesão. Quimiotaxia. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The interest in the study of the relationship between nutrition and immunity is increasing due to the hypothesis that the consumption of certain foods can reduce the susceptibility or the progression of diseases associated with the immune response. The aim of this study was to produce, characterize, and evaluate the biological activities of caseinphosphopeptides (CPP) in the inflammatory response as well as their antimicrobial and antioxidant abilities. To this end, CPP were produced by tryptic hydrolysis of sodium caseinate followed by acid precipitation, mineral aggregation, and precipitation with ethanol, during 2 and 4 hours at 37 and 50 °C. They were, then, characterized by assessing their centesimal composition, and by Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Mass Spectrometry, and High-performance Liquid Chromatography. After showing no cytotoxicity, human peripheral leukocytes from healthy subjects were exposed to the CPP and tested for (a) the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 expression by flow cytometry; (b) chemotaxis of granulocytes in Boyden chambers, (c) antimicrobial activity against Escherichia coli and Salmonella enteritidis by the microdilution test, and (d) determination of the antioxidant capacity, using the phosphomolybdenum and the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) methods. The results showed that the CPP had high protein and mineral content, and low molecular weight; the amino acid profile showed high and differentiated amounts of glutamic acid and serine according to the methodological procedures. With regard to the biological activities, the CPP did not influence the expression of LFA-1. For VLA-4, however, the CPP 2h/37°C decreased significantly its expression on lymphocytes as did the CPP 2h/50°C for granulocytes, and in contrast with the CPP 4h/37°C and 50°C, which significantly increased its expression integrin in granulocytes. Both the CPP 4h /37°C and 50°C significantly increased VLA-5 expression in lymphocytes and granulocytes. The CPP 4h/37°C and 50°C showed ability to induce granulocyte locomotion, in contrast with the inhibition showed by CPP 2h/37°C and 50°C. All hydrolysates showed antimicrobial activity for E. coli and S. enteritidis. They were also have demonstrated antioxidant capacity, which was better revealed by the TBARS assay. The results of this study indicate, for the first time, that CPP derived by tryptic hydrolysis of sodium caseinate can influence the non-specific inflammatory response, and as having antimicrobial and antioxidant activities, they may be helpful in promoting health in special conditions involving malnourished and immunocompromised patients or with gastrointestinal impairment due to inflammation.

KEYWORDS: Caseinphosphopeptides. Sodium caseinate. Inflammation. Adhesion molecules. Chemotaxis. Antimicrobial activity. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS (CPP) E SUA INTERRELAÇÃO.....	27
FIGURA 2 - EVENTOS LEUCOCITÁRIOS NA INFLAMAÇÃO.....	36
FIGURA 3 - MODELO DE QUIMIOTAXIA DE CÉLULAS POLARIZADAS PARA UM FORTE ESTÍMULO DIRECIONAL.....	44
FIGURA 4 - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS.....	51
FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DA CÂMARA DE BOYDEN UTILIZADA PARA OS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA.....	59
FIGURA 6 – CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS.....	64
FIGURA 7 - SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMINA (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDAS APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO CASEINATO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA.....	68
FIGURA 8 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 2H/37°C.....	70
FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 2h/50°C.....	71
FIGURA 10 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 4h/37°C.....	72
FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 4h/50°C.....	73
FIGURA 12 - NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE ACORDO COM O MÉTODO PCA - <i>PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS</i>	75
FIGURA 13 - GRÁFICO DO CONJUNTO DE DADOS BIDIMENSIONAIS, DEMONSTRANDO OS EIXOS DAS VARIÁVEIS LATENTES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC 1 E PC 2).....	76
FIGURA 14 - GRÁFICO DE LOADING DE PC 1 COMPOSTO POR CPP 2h/37 °C, CPP 2h/50°C E CPP 4h/37°C.....	78
FIGURA 15 - GRÁFICO DE LOADING DE PC 2 COMPOSTO POR CPP 2h/50°C, CPP 4h/37°C E CPP 4h/50°C.....	79

FIGURA 16 - COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA DOS CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	82
FIGURA 17 - EFEITO DA CASEÍNA BOVINA, CASEINATO DE SÓDIO E DOS CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE DE GRANULÓCITOS HUMANOS.....	86
FIGURA 18 - ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	87
FIGURA 19 - EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-5 E VLA-4 NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SADIOS TRATADOS COM O LOTE DE CPP 2h/37°C.....	89
FIGURA 20 - EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-5 E VLA-4 NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SADIOS TRATADOS COM O LOTE DE CPP 2h/50°C.....	90
FIGURA 21 - EFEITOS DA CASEÍNA E DO CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS HUMANOS.	96
FIGURA 22 - EFEITOS DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE A QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	97
FIGURA 23 - EFEITOS DO CASEINATO DE SÓDIO E DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ESCHERICHIA COLI PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	103
FIGURA 24 - EFEITOS DO CASEINATO DE SÓDIO E DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SALMONELLA ENTERITIDIS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	104
FIGURA 25 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CASEINATO DE SÓDIO E SEUS HIDROLISADOS RELATIVA À VITAMINA C PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO MOLIBDÊNIO.....	108
FIGURA 26 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CASEINATO DE SÓDIO E SEUS HIDROLISADOS RELATIVA À RUTINA PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO MOLIBDÊNIO.....	109
FIGURA 27 - ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CASEINATO DE SÓDIO E DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS PELO TESTE DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TEMPO E VAZÃO DE ELUENTES NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE, PARA SEPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS.....	55
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO CASEINATO DE SÓDIO E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE COM TRIPSINA PTN 6.0 EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.	65
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FRAÇÕES DE CPP OBTIDOS POR DIGESTÃO CONTROLADA DO CASEINATO DE SÓDIO COM TRIPSINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES.	66
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO RELATIVA DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NOS LOTES DE CPP OBTIDOS POR HIDRÓLISE TRÍPTICA DE CASEINATO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES OBTIDA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	83
TABELA 5 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS A CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS NA EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-4 E VLA-5 DETECTADA POR CITOMETRIA DE FLUXO.	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS DERIVADOS DO LEITE.	23
QUADRO 2 - PEPTÍDEOS BIOATIVOS DERIVADOS DO LEITE DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE COMO INGREDIENTES E ALIMENTOS FUNCIONAIS.	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	-	Absorvância
AAR	-	Atividade antioxidante relativa
ABAP	-	cloreto de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano)
Ala	-	Alanina
AMPc	-	Adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg	-	Arginina
Asp	-	Ácido Aspártico
atm	-	Unidade de medida da pressão atmosférica
ATP	-	Adenosina Trifosfato
BCAA	-	Aminoácidos de cadeia ramificada
BHT	-	Butil hidroxi tolueno
BSA	-	Soro de Albumina Bovina
C5a	-	Fragmento do sistema complemento que atua como agente quimiotático para neutrófilos
Ca ²⁺	-	Cálcio
CaCl ₂	-	Cloreto de cálcio
CaNa	-	Caseinato de sódio
Cas	-	caseína
CAT	-	catalase
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	-	carboximetilcelulose
CPP	-	Caseinofosfopeptídeos
CUR	-	Gás de Curtina
Cys	-	Cisteína
Da	-	Dalton
DG	-	Diacilglicerol
DGEA	-	Aspargina-glicina-ácido glutâmico-alanina
DIMS	-	Infusão Direta em Espectrometria de Massas
DP	-	Desvio Padrão
DPPH	-	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
E/S	-	Relação enzima substrato
ECA	-	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA-Na ₂	-	Ácido etilenodiaminotetracetato tripotássico
EILDV	-	Ácido Glutâmico-Isoleucina-Leucina-Aspargina-Valina
EM	-	Espectrometria de Massas
EP	-	Potencial de entrada
E-selectina	-	Selectina expressa no endotélio
ESI	-	Ionização do tipo <i>Eletrospray</i>
eV	-	Elétron-volt
F-actina	-	Actina filamentosa
FITC	-	Fluoresceína

fMLP	-	formil-metil-leucil-fenilalanina
FQ	-	Fatores quimiotáticos
FSC	-	<i>Forward Side Scatter</i>
g	-	Gramma
<i>g</i>	-	Unidade de aceleração
Glu	-	Ácido Glutâmico
Gly	-	Glicina
GNC	-	Granulócitos
GS1	-	Gás de nebulização
GSH	-	Glutathiona
Hcl	-	Ácido Clorídrico
His	-	Histidina
HIV-1	-	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HPLC	-	<i>High Pressure Liquide Chromatography</i>
IA	-	Índice Antioxidante
ICAM-1	-	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule-1</i>
ICAM-3	-	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule-3</i>
ICPOES	-	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado
IES-EM	-	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
IFN- γ	-	Interferon gama
IgA	-	Imunoglobulina A
IL-1	-	Interleucina 1
IL-4	-	Interleucina 4
IL-5	-	Interleucina 5
IL-6	-	Interleucina 6
IL-8	-	Interleucina 8
Ile	-	Isoleucina
IP ₃	-	Inusitol 1,4,5-trifosfato
IS	-	Voltagem do capilar
kDA	-	Kilo Dalton
kV	-	Kilovolt
LDV	-	Leucina-ácido aspártico-valina
Leu	-	Leucina
LFA-1	-	<i>Leukocyte function associated antigen 1</i>
LIN	-	Linfócito
LPS	-	Lipopolissacarídeo
L-selectina	-	Selectina expressa em leucócitos
LTB ₄	-	Leucotrieno B ₄
Lys	-	Lisina
M	-	Marcador de peso molecular
<i>m/z</i>	-	Massa carga
MA	-	Molécula de Adesão
MDA	-	Malonaldeído
MEC	-	Matriz extracelular

Met	-	Metionina
Mg ²⁺	-	Magnésio
MgCl ₂	-	Cloreto de Magnésio
MHC	-	Complexo principal de histocompatibilidade
MNC	-	Mononuclear
MON	-	Monócito
<i>mTor</i>	-	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Na ₂ HPO ₄	-	Fosfato dissódico
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NADPH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	Fosfato Monossódico Diidratado
NaHCO ₃	-	Bicarbonato de sódio
NaOH	-	Hidróxido de Sódio
NH ₄ Cl	-	Cloreto de amônio
NK	-	Natural Killer
°C	-	Graus Celsius
p/v	-	Peso por volume
PAF	-	Fator de Ativação Plaquetário
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfatos
PBSS	-	Solução salina tamponada com fosfatos e suplementada
PC	-	Principais componentes
PCA	-	Análise dos Componentes Principais
PD	-	Potencial de desagrupamento
PE	-	Ficoetrina
PECAM-1	-	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
Pept-1	-	Transportador de peptídeos
PGx	-	Glutaciona peroxidase
Phe	-	Fenilalanina
PIP ₂	-	Fosfatidil-inositol 4,5 bifoafato
PITC	-	Fenilisotiocianato
Pro	-	Prolina
P-selectina	-	Selectina expressa em plaquetas
PTN	-	proteína
<i>q.s.p</i>	-	Quantidade suficiente para
R1	-	Região delimitada para linfócitos
R2	-	Região delimitada para monócitos
R3	-	Região delimitada para granulócitos
RDA	-	Recomendação diária adequada
RGD	-	Arginina-glicina-asparagina
ROS	-	Espécies reativas de oxigênio
rpm	-	Rotações por minuto
SDS	-	Dodecilssulfato de sódio
SDS-PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio
Ser	-	Serina

SOD	-	Super óxido dismutase
SSC	-	<i>Side Light Scatter</i>
TA	-	Temperatura ambiente
TBA	-	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	-	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TEMED	-	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TFA	-	Ácido Trifluoracético
Thr	-	Treonina
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral α
TSA	-	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	-	<i>Trypticase Soy Broth</i>
Tyr	-	Tirosina
UFC	-	Unidade formadora de colônia
UV	-	Ultravioleta
UV-vis	-	Ultravioleta-visível
V	-	volts
v/v	-	Volume por volume
Val	-	Valina
VCAM-1	-	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA	-	<i>Very Late Activation Antigens</i>
VLA-4	-	<i>Very Late Activation Antigen-4</i>
VLA-5	-	<i>Very Late Activation Antigen-5</i>
VLA-6	-	<i>Very Late Activation Antigen-6</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 JUSTIFICATIVA.....	20
1.2 HIPÓTESES	21
1.3 OBJETIVOS	21
1.3.1 Geral.....	21
1.3.2 Específicos	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 AS PROTEÍNAS DO LEITE BOVINO COMO FONTE DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS ..	22
2.2 CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS	24
2.2.1 Obtenção	24
2.2.2 Caracterização.....	25
2.2.3 Atividades nutricionais e biológicas de CPP	26
2.2.3.1 Absorção de Minerais	27
2.2.3.2 Calcificação óssea.....	29
2.2.3.3 Efeitos anticariogênicos	29
2.2.3.4 Atividade antioxidante.....	30
2.2.3.5 Efeitos sobre a pressão arterial	31
2.2.3.6 Modulação do sistema imunológico.....	32
2.2.4 Utilização de caseinofosfopeptídeos como alimentos funcionais	33
2.3 MECANISMOS DE DEFESA.....	35
2.3.1 Inflamação e resposta inflamatória	35
2.3.1.1 Adesão celular	39
2.3.1.2 Quimiotaxia.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 SOLUÇÕES.....	47
3.1.1 Solução de acrilamida 30%	47
3.1.2 Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e Tampão Tris-HCl 1M pH 6,8	47
3.1.3 Gel de corrida (20 mL).....	47
3.1.4 Gel de alinhamento.....	47
3.1.5 Tampão de carregamento das amostras 2X (10 mL)	48

3.1.6 Tampão de corrida.....	48
3.1.7 Solução corante de gel.....	48
3.1.8 Solução descorante de gel.....	48
3.1.9 Marcador de Peso Molecular.....	48
3.1.10 Solução de Re-secagem.....	48
3.1.11 Reagente de Derivatização.....	48
3.1.12 Solução diluente para CLAE.....	48
3.1.13 Solução padrão de aminoácidos para análise por CLAE.....	49
3.1.14 Solução salina fisiológica.....	49
3.1.15 Solução salina tamponada com fosfatos (PBS).....	49
3.1.16 Solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v).....	49
3.1.17 PBS suplementado (PBSS).....	49
3.1.18 Solução hemolisante de eritrócitos.....	49
3.1.19 Solução de caseína à 5% (p/v).....	49
3.1.20 Solução de caseinato de sódio à 5% (p/v).....	50
3.1.21 Soluções de CPP à 5% (p/v).....	50
3.1.22 Solução de paraformaldeído 1% (p/v).....	50
3.1.23 Solução reagente do complexo Molibdênio.....	50
3.1.24 Soluções reagentes para avaliação de espécies reativas do Ácido Tiobartitúrico (TBA).....	50
3.2 OBTENÇÃO DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS.....	50
3.2.1 Avaliação da composição centesimal.....	52
3.2.2 Caracterização dos CPP por Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE).....	52
3.2.3 Análise dos CPP por infusão direta em espectrômetro de massas (DMIS).....	53
3.2.3.1 Instrumentação e condições de análise.....	53
3.2.3.2 Preparo de amostras.....	54
3.2.3.3 Análises quimiométricas.....	54
3.2.4 Determinação e quantificação dos aminoácidos hidrolisados dos CPP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	55
3.2.4.1 Reação de Hidrólise dos CPP.....	55
3.2.4.2 Análise de Aminoácidos.....	56
3.3 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	56

3.3.1 Separação das populações de leucócitos humanos para ensaios de expressão de moléculas de adesão.....	56
3.3.2 Separação das populações de leucócitos humanos para ensaios de quimiotaxia ..	57
3.3.3 Viabilidade celular.....	57
3.3.4 Ensaios de citotoxicidade da caseína, caseinato de sódio e dos CPP	58
3.4 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO EM LEUCÓCITOS.....	58
3.5 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS	59
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	60
3.6.1 Reativação dos microorganismos.....	60
3.6.2 Teste de Microdiluição em Caldo.....	60
3.7 ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	61
3.7.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.....	61
3.7.2 Espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	61
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
3.9 REFERÊNCIAS – FORMATAÇÃO.....	62
4 RESULTADOS	63
4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS.....	63
4.1.1 Avaliação da composição centesimal	63
4.1.2 Caracterização dos CPP.....	67
4.1.3 Espectrometria de massas	68
4.1.4 Determinação do conteúdo de aminoácidos por CLAE	77
4.2. ENSAIOS COM LEUCÓCITOS HUMANOS.....	84
4.2.1. Toxicidade	84
4.2.2 Expressão de moléculas de adesão	85
4.2.3 Quimiotaxia.....	95
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	102
4.4 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	106
4.4.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.....	107
4.4.2 Espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico	109
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
REFERÊNCIAS	115
ANEXO.....	131

1 INTRODUÇÃO

A relação entre dieta e saúde é bem conhecida por ser um eixo importante na promoção de bem-estar e na redução de doenças. Cada vez mais, a atenção dos pesquisadores se concentra na descoberta e utilização de alimentos e ingredientes funcionais e esta tem sido a base do crescimento do mercado desses alimentos, os quais, além do seu valor nutritivo, exercem influência positiva sobre a saúde humana.

Em muitos casos, é possível, quando se empregam proteínas como agentes funcionais, desenvolver produtos com características especiais, além de agregar valor a subprodutos que, com frequência, representam problemas para as indústrias.

Proteínas do leite bovino são ingredientes importantes em muitos produtos alimentícios e nutricionais devido às suas diversas propriedades funcionais, nutricionais e tecnológicas.

Os peptídeos bioativos de origem animal mais estudados são os produtos lácteos, os quais, após hidrólise, apresentam algumas funções específicas que os tornam agentes promotores de saúde (McCann et al., 2006).

Dentre os peptídeos derivados da caseína que apresentam atividade biológica estão os caseinofosfopeptídeos (CPP), descritos há mais de 50 anos. Porém, ainda não estão completamente caracterizados em relação aos mecanismos por meio dos quais exercem seus efeitos e formas de aplicação em alimentos (Krüger; Cândido, 2009).

1.1 JUSTIFICATIVA

Há interesse cada vez maior no estudo da relação entre nutrição e imunidade devido à hipótese de que o consumo de determinados alimentos pode reduzir a susceptibilidade e/ou a progressão de doenças associadas à resposta imunológica (Sandré et al., 2001).

A maioria dos estudos evidencia o efeito de peptídeos e hidrolisados de proteínas específicas no sistema imunológico e algumas investigações examinam

seu impacto na imunidade inespecífica ou inata (Cánovas et al., 2011). A inflamação é, por sua vez, envolvida na iniciação e patogênese de várias doenças crônicas. Portanto, a identificação de componentes que possam interferir neste processo e a possibilidade de formulação de alimentos funcionais com CPP produzidos *in vitro*, que possam regular processos orgânicos quando ingeridos diariamente, é altamente desejável, podendo ser visto como uma contribuição importante na proteção à saúde e/ou na redução de doenças crônicas.

1.2 HIPÓTESES

Os caseinofosfopeptídeos podem contribuir para com a resposta inflamatória não específica, bem como apresentam atividades antimicrobiana e antioxidante.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

Produzir, caracterizar e identificar as atividades biológicas *in vitro* dos caseinofosfopeptídeos derivados de caseinato de sódio bovino nas respostas inflamatória, antimicrobiana e antioxidante.

1.3.2 Específicos

- Produzir caseinofosfopeptídeos a partir do caseinato de sódio do leite bovino;
- Determinar as características físico-químicas dos caseinofosfopeptídeos;
- Investigar seus efeitos:
 - sobre a expressão das integrinas LFA-1, VLA-4 e VLA-5;
 - na quimiotaxia de granulócitos;
 - na atividade antibacteriana contra patógenos gram-negativos
 - na atividade antioxidante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS PROTEÍNAS DO LEITE BOVINO COMO FONTE DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

O leite bovino e seus derivados fornecem 30% das proteínas consumidas pela população, oferecendo grande quantidade de nitrogênio e aminoácidos essenciais para a nutrição de crianças e adultos (Meisel et al., 1989).

As proteínas do leite bovino podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e d) enzimas de crescimento (Sgarbieri, 2005). Dessas, a caseína é o maior grupo, constituindo aproximadamente 80% da parte proteica do leite bovino (Antunes, 2003; Tauzin et al., 2003).

Quase todas as caseínas do leite estão organizadas em micelas com um diâmetro médio de 120 nm contendo 93% de proteínas e 7% de ácidos inorgânicos, principalmente cálcio e fosfato (Léonil et al., 2000). Sua principal função fisiológica é manter os minerais estáveis para posterior absorção (Phadungath, 2005).

As caseínas são moléculas eletronegativas que contêm fósforo e um grande número de aminoácidos, dentre os quais os mais abundantes são o ácido glutâmico, a leucina e a prolina. O fósforo está presente nas moléculas em forma de monoéster fosfórico dos aminoácidos serina e treonina (Veisseyre, 1988; Léonil et al., 2000; Tauzin et al., 2003).

Existem quatro variáveis genéticas da caseína: α (como α_{s1} - e α_{s2} -), β , κ e γ , cujas modificações na estrutura das cadeias peptídicas são mínimas, mas produzem diferenças importantes em suas propriedades (Veisseyre, 1988; Tauzin et al., 2003).

Devido à composição e sequência de aminoácidos característicos, as caseínas são moléculas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária. Essa característica estrutural relativamente aberta e flexível das caseínas deve-se ao elevado teor de prolina, a qual tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária. Em contrapartida, as estruturas terciárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas (Sgarbieri, 2005).

A caseína é uma importante fonte de peptídeos bioativos (Pihlanto-Leppälä, 2001; Phelan et al., 2009a) e sua hidrólise pode ser realizada *in vitro* por meio de

enzimas (Rossini, 2007) microbianas, animais e vegetais ou, ainda, por fermentação de bactérias ácido-láticas (Phelan et al., 2009a).

É reconhecido que peptídeos, e não apenas aminoácidos, são os principais produtos da digestão proteica do leite (Arsenio et al., 2010). Torna-se, portanto, evidente que a consideração do valor proteico deve levar em conta a relação entre a estrutura proteica e a composição dos peptídeos liberados durante a digestão no trato gastrointestinal (Meisel et al., 1989).

Os peptídeos com atividade biológica, ou peptídeos bioativos, podem ser definidos como uma sequência de aminoácidos inativos no interior da proteína precursora que são liberados mediante hidrólise química ou enzimática e passam a exercer determinadas atividades biológicas (Pihlanto-Leppälä, 2001; Miquel et al., 2005). Geralmente são moléculas compostas por três a vinte aminoácidos liberados por hidrólise, seja pelo processo industrial de alimentos ou por digestão gastrointestinal (Pihlanto-Leppälä, 2001).

A base molecular da funcionalidade de proteínas alimentares é relacionada com seus atributos intrínsecos como tamanho, composição e sequência de aminoácidos, bem como suas características físico-químicas (Léonil et al., 2000).

Como ilustra o Quadro 1, os peptídeos bioativos do leite podem agir no organismo humano como componentes regulatórios, com capacidade para modular funções fisiológicas específicas seja no trato gastrointestinal ou sistemicamente, dependendo da composição e da sequência de aminoácidos.

FUNÇÃO	SISTEMA
Anti-hipertensivo Antioxidante Antitrombótico Hipocolesterolemiantes Respostas vaso-regulatórias	Cardiovascular
Opióide: Atividade agonista e antagonista	Nervoso
Absorção mineral Diminuição do apetite Antimicrobiano Aumento do trânsito intestinal Atividade antidiarreica	Gastrointestinal
Imunomodulatória Citomodulatória Antimicrobiano	Imunológico
Performance atlética Recuperação da musculatura	Músculo-esquelético

QUADRO 1 - FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS DERIVADOS DO LEITE.

FONTE: Adaptado de Korhonen; Pihlanto, 2006; Hartmann; Meisel, 2007; Mills et al., 2011.

2.2 CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS

Os caseinofosfopeptídeos (CPP) são os peptídeos mais importantes liberados pela hidrólise da caseína (Krüger, 2006). Foram primeiramente citados por Mellander na década de 50, que os descreveu como peptídeos fosforilados derivados da caseína que aumentavam os níveis de vitamina D em crianças com raquitismo (FitzGerald, 1998; Krüger; Cândido, 2009).

Os CPP referem-se, de fato, a peptídeos fosforilados, com diferentes pesos moleculares, ricos em fósforo e serina, formados *in vivo* e *in vitro*, quando a caseína é degradada (Kitts, 2005; Miquel et al., 2005; Mills et al., 2011). Eles contêm, em sua estrutura primária, uma sequência de aminoácidos carregada negativamente em pH fisiológico, constituída por resíduos de ácido glutâmico e serina fosforilada (Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu) que ocorre em α_{s1} -caseína, β -caseína e em α_{s2} -caseína (Erba; Ciappellano; Testolin 2002; Meisel, et al., 2003; Kitts, 2005).

2.2.1 Obtenção

Os CPP estão codificados dentro da sequência primária das caseínas e devem ser liberados para se tornarem ativos por meio dos seguintes processos:

- Hidrólise *in vitro* seguida de incubação com enzimas proteolíticas de origem microbiana, mamífera e vegetal ou através de tratamentos químicos e processos físicos como o ultra-som e o microondas. Caseinofosfopeptídeos são comumente produzidos por ação da tripsina (Meisel et al., 1989; Clare; Swaisgood, 2000; Korhonen; Pihlanto, 2006; Gravaghi et al., 2007) seguida de precipitação (Gravaghi et al., 2007), agregação mineral e nova precipitação com solvente (Adamson; Reynolds, 1996; FitzGerald, 1998). Segundo Adamson e Reynolds (1995), para a obtenção de fosfopeptídeos de caseína contendo predominantemente o grupo de sequência [-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-], o melhor método é a precipitação seletiva com agregação de Ca^{2+} e etanol em pH 4,6.
- Hidrólise por bactérias proteolíticas/peptídicas durante a fabricação de leites fermentados e queijos. Tal hidrólise pode ocorrer também *in vivo*, pela ação da

microflora intestinal de mamíferos, incluindo a humana (Korhonen; Pihlanto, 2006).

- Digestão *in vivo* através da ação combinada de hidrolases gástricas e pancreáticas. Durante o trânsito gastrintestinal, peptidases séricas e epiteliais podem mediar, além da degradação, o transporte através da mucosa intestinal e a transferência para a corrente sanguínea. Diversos estudos *in vivo* demonstram que essas moléculas podem ser detectadas na porção distal do intestino delgado após o consumo de leite, leites fermentados, iogurtes e caseína, demonstrando que os CPP são produzidos e resistem à digestão proteolítica (Meisel et al., 1989; 2003; Reynolds; Riley; Adamson, 1994; Adamson; Reynolds, 1996; Chabance et al., 1998; Tomé; Debabbi, 1998; Clare; Swaisgood, 2000; Korhonen; Pihlanto, 2006). Seu tempo de liberação depende do tempo da digestão da refeição, mas geralmente ocorre entre 2 e 5 horas (Scholz-Ahrens; Schrezenmeir, 2000).

É interessante destacar que, dependendo do tipo de enzima empregada na hidrólise e as condições de processamento, os peptídeos obtidos são distintos, assim como sua atividade biológica (Wang; Mejia, 2005; Cánovas et al., 2011; García-Nebot et al., 2011).

2.2.2 Caracterização

Além da função alvo, há a necessidade de caracterizar os hidrolisados proteicos estabelecendo suas propriedades físico-químicas. Para o objetivo de separação, muitos métodos podem ser usados, como a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), eletroforese capilar ou técnicas cromatográficas. Após a separação, peptídeos devem ser identificados quanto à composição e sequência de aminoácidos. Para análise de aminoácidos, a cromatografia líquida é o método mais utilizado, comumente acoplada a um detector de UV convencional e detectores de fluorescência. Para sequenciar aminoácidos, utiliza-se a degradação de Edman e a análise de espectrometria de massas (EM) (Léonil et al., 2000; Miranda et al., 2004).

O recente advento de técnicas de ionização possibilitou à EM a detecção e caracterização de biomoléculas com alta acurácia (0,01%). Em adição, a análise por EM pode ser ampliada pela fragmentação induzida por colisão como processada

pelo sistema triplo quadrupolo ou por novas interfaces de *design* (como fonte MALDI) para informar sobre o peso molecular, a caracterização estrutural ou modificações quimicamente induzidas (Crotti et al., 2006). A cromatografia líquida e a EM têm sido particularmente usadas para a caracterização de peptídeos alimentares, especialmente de produtos lácteos (Léonil et al., 2000).

2.2.3 Atividades nutricionais e biológicas de CPP

Caseinofosfopeptídeos podem, sob certas circunstâncias, exercer efeitos específicos à saúde quando ingeridos como parte de uma dieta láctea (Korhonen; Pihlanto, 2006)

A relevância nutricional desses hidrolisados decorre da origem da proteína (qualidade e quantidade de aminoácidos, sobretudo essenciais), da forma de hidrólise e da dimensão da cadeia peptídica. Uma proteína de alta qualidade contém aminoácidos essenciais em proporções similares àsquelas necessárias ao ser humano (Morais et al., 2002).

As principais aplicações nutricionais dos hidrolisados proteicos é na redução da alergenicidade ou no aumento da digestibilidade. Para ambas as aplicações, pequenos peptídeos são necessários por conterem baixa antigenicidade e serem mais rapidamente absorvidos no intestino delgado em relação à proteínas intactas e aminoácidos livres (Léonil et al., 2000). Nesse sentido, os hidrolisados proteicos têm sido amplamente utilizados, especialmente na produção de alimentos para fins especiais para diversos grupos populacionais com finalidades terapêuticas relacionadas à manutenção do estado nutricional, como por exemplo, de recém-nascidos prematuros, crianças e adultos com má absorção e com alergia a proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade. Ainda, estes hidrolisados podem ser benéficos na suplementação de idosos, em nutrição enteral, na nutrição desportiva e em dietas para o controle do peso (Morais et al., 2002; Silva et al., 2010).

A literatura descreve muitas atividades biológicas integradas dos CPP, como esquematizado na Figura 1. As principais alegações das funções dos CPP obtidos por hidrólise trípica do caseinato de sódio são as de coadjuvantes no tratamento de

doenças dentais, na perda de massa óssea e no aumento da absorção de minerais, especialmente do cálcio (Meisel; Frister; Sehlime, 1989), funções essas com direta relação nutricional.

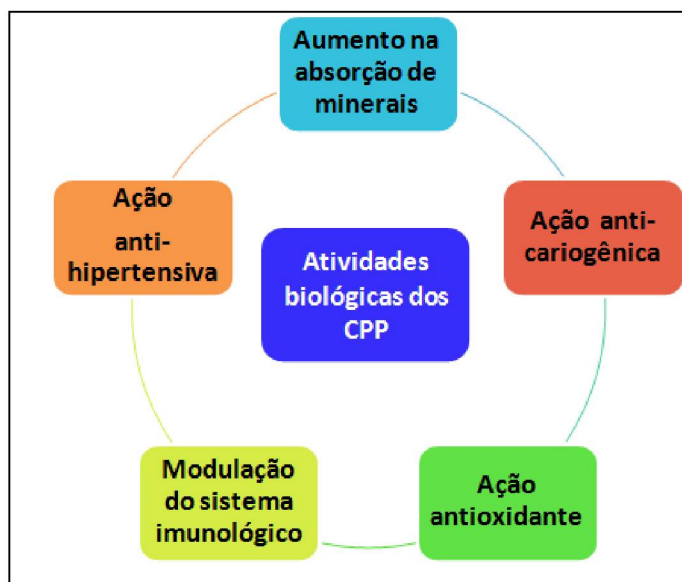


FIGURA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CASEINOFOSFO-PEPTÍDEOS (CPP) E SUA INTERRELAÇÃO.

FONTE: Meisel; et al. (1989); Clare; Swaisgood (2000); Otani et al. (2000); Meisel et al. (2003); Korhonen; Pihlanto (2006); Kitazawa et al. (2007); Mora-Gutierrez et al. (2007); Krüger; Cândido (2009); García-Nebot et al. (2011); Mills et al. (2011).

2.2.3.1 Absorção de Minerais

Em relação à absorção de minerais, os CPP apresentam atividade sequestrante de metais divalentes como o cálcio, o manganês e o ferro e, ainda, de elementos traços como o zinco, o bário, o cromo, o níquel, o cobre e o selênio. Muitos minerais são dissociados dos alimentos no pH ácido do estômago e podem, gradualmente, tornar-se insolúveis no intestino quando o pH se torna alcalino. Caseinofosfopeptídeos possuem a habilidade de formar complexos solúveis com minerais, especialmente com o cálcio, prevenindo sua precipitação como fosfato de cálcio (Holt; Wahlgren; Drakenberg, 1996; Miquel et al., 2005; Hartmann; Meisel, 2007). Kitts e Yuan (1992), Tsuchita et al. (1996) e Ferraretto e colaboradores (2001)

também citam o envolvimento dos CPP no transporte de cálcio dentro de vários tecidos biológicos, incluindo maior absorção através da mucosa intestinal e aumentando a biodisponibilidade desse íon no leite.

Cosentino e colaboradores (2010) mostraram que CPP enriquecidos com cálcio promovem agregação e aumento da absorção mineral pelas células, indiferente da quantidade de cálcio extracelular, indicando que o cálcio ligado aos CPP é responsável pela bioatividade. Quando utilizaram CPP descalcificados, o cálcio livre disponível na solução também promoveu agregação e aumento da absorção intestinal, mas foram dependentes do cálcio extracelular. Gravaghi et al. (2007) estudaram a relação entre a captação de cálcio em células HT-29 e a estrutura supramolecular dos CPP e concluíram que estes são capazes de agregar-se à polímeros e favorecer o fluxo extracelular de cálcio nessas células. Visto que os efeitos estimulantes na absorção de cálcio não dependem da vitamina D, é possível concluir que os CPP agem por absorção passiva (Scholz-Ahrens; Schrezenmeir, 2000).

Quando adicionados à alimentação, os CPP aumentam a absorção do cálcio intestinal (Ferraretto et al., 2001; Mora-Gutierrez et al., 2007). Contudo, estudos mais antigos não encontraram os mesmos resultados. Scholz-Ahrens, Kopra e Barth (1980), Pointillart, Guéguen (1989) e Brommage, Juillerat e Jost (1991) mostraram que dietas suplementadas com CPP não apresentavam influência sobre a absorção de cálcio e sobre a mineralização óssea. As controvérsias podem ser derivadas das diferenças na composição dos CPP utilizados, aos diferentes modelos experimentais (animais ou humanos), ao uso de diferentes fontes de CPP (leite, leite fortificado com cálcio, CPP adicionados ao leite) e/ou ainda, às diferentes fontes de sais de cálcio.

O mecanismo pelo qual os CPP exercem seus efeitos sobre o aumento da biodisponibilidade dos minerais divalentes parece ser devido à presença de grupos fosfato provenientes de resíduos de serina fosforilada em estreita proximidade com a cadeia peptídica, criando um domínio polar ácido favorável à absorção (Hansen et al., 1996; Phelan et al., 2009a).

Hansen, Sandström e Lönnerdal (1996) relataram que a adição de 14 μmol de CPP.L⁻¹ em sistema de cultura de células Caco-2 permitiu boa biodisponibilidade de zinco em dietas com alto teor de fitatos, enquanto que altos níveis (>36 μmol de

CPP.L⁻¹) inibiram a captação do zinco. Etcheverry et al. (2004) avaliaram a biodisponibilidade do zinco de leite humano com CPP, sob uma variedade de sais de cálcio em células Caco-2. Alta captação de zinco foi obtida com leite humano enriquecido com CPP, gluconato e glicerofosfato de cálcio em relação às outras formas de cálcio. Esses estudos indicam que o tipo de sal de cálcio e a dose de CPP são importantes fatores na biodisponibilidade de zinco. Em relação ao ferro, Kibangou et al. (2005) referem que CPP oriundos de frações da β -caseína aumentam sua absorção, ao contrário dos CPP da α_s -caseína.

2.2.3.2 Calcificação óssea

Na calcificação óssea, estudos mostram que os CPP modulam a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas, além de favorecerem o depósito de cálcio na matriz extracelular (MEC), sendo, portanto, articuladores da atividade celular óssea (Donida et al., 2009; Cosentino et al., 2010; Tulipano et al., 2010). Scholz-Ahrens e Schrezenmeir (2000) concluíram que os CPP também podem suprimir a reabsorção óssea, além de estimular sua mineralização. Assim, esses peptídeos podem ser empregados como produtos coadjuvantes no tratamento de doenças como a osteopenia e a osteoporose.

2.2.3.3 Efeitos anticariogênicos

Os CPP são citados por melhorar a saúde oral, notavelmente pelo seu papel na promoção da remineralização do esmalte dentário (Korhonen; Pihlanto, 2006; Hartmann; Meisel, 2007) e aumentar a atividade do flúor, evitando assim, o aparecimento de cáries (Llena; Forner; Baca, 2009; Bhat et al., 2012).

Kanekanian et al. (2008) referem que os CPP protegem contra a erosão dental em situações de pH na faixa de 2,5-4,5, provavelmente por formarem um revestimento sobre as superfícies minerais, protegendo-as da erosão.

O mecanismo proposto para o efeito anticariogênico é devido aos CPP concentrarem fosfato de cálcio amorfo na placa dental, o qual atuaria como um tampão de íons cálcio e fosfato livres, evitando a desmineralização do esmalte

dentário pelo ácido oriundo da placa bacteriana (Adamson; Reynolds, 1996; Ferrazzano et al., 2012).

Com os recentes desenvolvimentos nos tratamentos minimamente invasivos, o interesse em agentes remineralizantes como os CPP estão se tornando promissores na Odontologia. Como consequência, CPP têm sido desenvolvidos comercialmente como ingredientes naturais oriundos de proteínas lácteas, e adicionados a produtos de higiene oral. Embora não disponível no mercado nacional, comercialmente já é possível encontrar pastas dentais, gomas de mascar e enxaguantes bucais, inclusive produtos profissionais, enriquecidos com CPP, além de gêneros alimentícios (Cross; Huq; Reynolds, 2007; Mills et al., 2011; Nongonierma; FitzGerald, 2012).

2.2.3.4 Atividade antioxidante

Estudos recentes têm demonstrado que peptídeos antioxidantes podem ser liberados pela hidrólise da caseína por digestão enzimática e por fermentação ácido-lática. A maioria dos peptídeos identificados são derivados da α_s -caseína e apresentam atividade anti radical livre inibindo a peroxidação lipídica por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Os mecanismos enzimáticos envolvem o sistema de defesa e incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (PGx), as quais funcionam como antioxidantes preventivos, interceptando espécies oxidativas antes do dano ocorrer. Mecanismos não enzimáticos incluem elementos traço, coenzimas e co-fatores (Power; Jakeman; FitzGerald, 2013).

Segundo García-Nebot e colaboradores (2011), os CPP protegem as células contra danos oxidativos, preservando a viabilidade celular, aumentando o conteúdo de glutathiona (GSH), induzindo a atividade da CAT, diminuindo a peroxidação lipídica e mantendo uma correta progressão do ciclo celular. No entanto, não exercem proteção em nível mitocondrial, o que implica um efeito parcial e sítio-específico.

CPP também são referidos por apresentarem habilidade de sequestrar radicais livres, bem como quelar metais de transição como cálcio, ferro, cobre e

zinco (Kim; Jang; Kim, 2007). Há dados que sugerem o uso de CPP na prevenção de dano oxidativo em alimentos cárneos (Díaz; Decker, 2004; Sakanaka et al., 2005).

A capacidade antioxidante de CPP contra radicais livres tem correlação positiva com o conteúdo de histidina, lisina, prolina e tirosina (Kim; Jang; Kim, 2007; Power; Jakeman; FitzGerald, 2013). Desta forma, podem ser usados como ingredientes de alimentos funcionais e na prevenção da rancificação de alimentos sem interferir em outros parâmetros de qualidade (Phelan et al., 2009a).

2.2.3.5 Efeitos sobre a pressão arterial

Recentemente muitas evidências científicas sobre peptídeos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) têm surgido, principalmente devido à prevalência e a importância da hipertensão arterial na população ocidental. A ECA é uma enzima que cataliza a conversão da Angiotensina I em Angiotensina II, a qual tem ação vasoconstritora e estimula a secreção de aldosterona, hormônio responsável pela indução da excreção de potássio, pela retenção de sódio e água e por neutralizar a produção de renina, a qual libera Angiotensina I. Este sistema é o mais importante entre os diferentes mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores envolvidos na regulação da pressão sanguínea (Cánovas et al., 2011).

Contreras e colaboradores (2009; 2011) demonstraram que peptídeos derivados da caseína apresentam atividade anti-hipertensiva em animais. Postula-se que os peptídeos anti-hipertensivos podem não ser absorvidos no trato intestinal, exercendo função no lúmen intestinal mediante interação com receptores que se encontram na parede do intestino (Cánovas et al., 2011). Entretanto, muitos estudos utilizam hidrolisados de caseína para avaliar a atividade anti-hipertensiva, porém nem sempre os caracterizam como CPP (FitzGerald; Meisel, 2000; Minervini et al., 2003; Contreras et al., 2009; 2011).

2.2.3.6 Modulação do sistema imunológico

Dentre os efeitos citomodulatórios citados na literatura, os CPP demonstraram inibir a proliferação de células cancerígenas, estimulam a atividade de células imunocompetentes e, também, de células intestinais de neonatos (Meisel; Frister; Sehlime, 1989; Meisel; FitzGerald, 2003). Hartmann e Meisel (2002; 2004) citam que os CPP não apresentam efeitos adversos em termos de citotoxicidade e não interferem na diferenciação celular ou na integridade de células intestinais humanas.

Kitts e Nakamura (2006) mostraram que apenas um dos CPP produzidos a partir da caseína (CPPs-III) estimulou a indução de interleucina 6 (IL-6) em células Int-40. Em células Caco-2, esses CPP aumentaram a expressão de IL-6 e o fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (Kawahara; Otani, 2004). Conseqüentemente, é esperado que CPP ingeridos oralmente aumentem a resposta imunológica via regulação dos níveis de IL-6 das células epiteliais intestinais.

Otani, Nakano e Kawahara (2003) sugerem que CPP adicionados à dieta podem proteger o hospedeiro contra microrganismos patogênicos por aumentarem os níveis séricos de IgA, IL-5 e IL-6. Ainda, sugerem seu uso em dietas enterais imunomodulatórias, a fim de aumentar a resposta do hospedeiro via IgA. Este relato contrasta com o de Stuknyte et al. (2011), pois esses autores não encontraram atividade imunomodulatória com hidrolisados de caseína, contudo, eles não caracterizam seus hidrolisados como CPP.

Mesmo com o fato de que tenham sido descritos há mais de 50 anos, os CPP ainda não foram bem caracterizados quanto ao seu potencial como um ingrediente ou um alimento funcional para o consumo humano e poucas informações estão disponíveis em relação ao consumo de CPP e a resposta do sistema imunológico inato em humanos.

Assim, o conhecimento das atividades biológicas dos CPP produzidos *in vitro* se torna importante, pois poderá levar ao desenvolvimento de novos produtos reguladores do sistema imunológico, auxiliando a defesa do hospedeiro contra inflamações e infecções.

2.2.4 Utilização de caseinofosfopeptídeos como alimentos funcionais

A expressão “alimentos funcionais” foi inicialmente proposta pelo governo japonês, em meados da década de 80, como resultado de esforços para o desenvolvimento de alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando-se a elevada expectativa de vida naquele país (Costa; Rosa, 2010).

Alimentos funcionais foram, então, definidos como alimentos processados, similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal e que, além de suas funções básicas nutricionais, comprovadamente trazem benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas. São conhecidos como alimentos para uso específico de saúde (FOSHU, do inglês, *foods for specified health use*). Esse princípio foi logo adotado mundialmente, mas as denominações das alegações ou *claims*, bem como os critérios para sua aprovação variam de acordo com a regulamentação de cada país ou de blocos econômicos (Hasler, 2002).

No Brasil, a legislação atual não define “alimento funcional”, mas define alegação de propriedade funcional, relativa ao papel metabólico ou fisiológico, e alegação de propriedade de saúde, a qual afirma ou sugere a relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (Brasil, 1999).

Os potenciais benefícios à saúde pelos CPP têm sido objeto de crescente interesse comercial no contexto de alimentos funcionais promotores de saúde. Alguns peptídeos bioativos não são liberados sob condições fisiológicas *in vivo* e em quantidades satisfatórias, mas podem ser produzidos industrialmente e utilizados como ingredientes em alimentos funcionais (Meisel; Bockelmann, 1999), como acontece em países como os Estados Unidos, a Holanda e o Japão, que os empregam nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Caseinofosfopeptídeos podem ser incorporados na forma de ingredientes em alimentos funcionais, suplementos alimentares e até mesmo produtos farmacêuticos com o objetivo de oferecer benefícios de saúde específicos. O Quadro 2 ilustra a aplicação de peptídeos do leite, bem como de CPP pela indústria de alimentos. Essa tendência deverá continuar com o aumento do conhecimento sobre as funcionalidades dos peptídeos.

PEPTÍDEOS BIOATIVOS	ALEGAÇÃO DE SAÚDE	TIPO DE PRODUTO	MARCA	FONTE
VPP, IPP da β -caseína e κ -caseína	redução da pressão arterial	coalhada	<i>Calpis</i>	<i>Calpis Co, Japão</i>
VPP, IPP da β -caseína e κ -caseína	redução da pressão arterial	leite fermentado, enriquecido com cálcio	<i>Evolus</i>	<i>Davisco, EUA</i>
Peptídeos do soro do leite	redução da pressão arterial	isolado do soro do leite hidrolisado	BioZate	<i>Davisco, EUA</i>
Caseína derivada do decapeptídeo FFVAPFEVFGK	redução da pressão arterial	ingrediente	C12 Peption	DMV, Holanda
Caseína derivada do decapeptídeo FFVAPFEVFGK	redução da pressão arterial	refrigerante	Casein DP Peptio Drink	Kanebo, Japão
Glicomacropéptídeo κ -caseína (106-169)	anticariogênico, antimicrobiano, antitrombótico, redução do estresse	bebida láctea	CSPHP ProDiet F200	Ingredia, França
Caseinofosfopeptídeos	ajuda na absorção mineral	ingrediente	Capolac	Arla Foods, Dinamarca
Caseinofosfopeptídeos	ajuda na absorção mineral	refrigerante	Tekkotsu Inryou	Suntory, Japão
Caseinofosfopeptídeos	ajuda na absorção mineral	refrigerante	Kotsu Kotsu Calcium	Asahi, Japão
Caseinofosfopeptídeos	ajuda na absorção mineral	ingrediente	CE90CPP	DMV, Holanda
Peptídeos ricos em Glutamina	imunomodulatório	proteína do leite em pó hidrolisado	Glutamine Peptide	DMV, Holanda
α_{s1} -caseína (1-6) RPKHPI (1-7)	redução da pressão arterial	queijo magro duro fermentado	Festivo	MTT Agrifood Research, Finlândia
Peptídeo derivado do leite	aumentar a energia, melhora a qualidade do sono	ingrediente	Cysteine peptide	DMV, Holanda
Peptídeos derivados da caseína	melhora a performance atlética e recupera musculatura	ingrediente	PeptoPro	DSM, Holanda
Peptídeo derivado do soro do leite	auxilia o relaxamento e o sono	ingrediente	Vivinal Alpha	Borcula Domo Ingredients (BDI), Holanda
Caseinofosfopeptídeos	anticariogênico	goma de mascar	Recaldent	Cadbury Enterprises
Peptídeos derivados do leite	redução da pressão arterial	margarina	Evolus Double Effect Spread	Valio, Finlândia

QUADRO 2 – PEPTÍDEOS BIOATIVOS DERIVADOS DO LEITE DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE COMO INGREDIENTES E ALIMENTOS FUNCIONAIS.

FONTE: Mills et al. (2011).

Atualmente, esta abordagem é direcionada para grupos-alvo, mas acabará por abordar indivíduos, introduzindo o novo conceito de “nutrição personalizada” (Korhonen; Pihlanto, 2006). Muitas questões científicas, tecnológicas e regulatórias

devem, contudo, ser resolvidas antes que essas substâncias possam ser aproveitadas para esse fim.

De acordo com o exposto, estudos sobre as atividades biológicas dos CPP são importantes, a fim de utilizá-los como promotores de saúde, além de serem empregados como alimentos funcionais, beneficiando a segurança alimentar e nutricional da população e possibilitando a redução de gastos com saúde pública.

2.3 MECANISMOS DE DEFESA

2.3.1 Inflamação e resposta inflamatória

Todos os organismos vivos, desde os procariontes até o homem, apresentam mecanismos adaptativos para contrapor estímulos invasivos a fim de manter o equilíbrio homeostático do organismo. Esses mecanismos incluem alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas que, coletivamente, caracterizam a inflamação (Voltarelli, 1994).

O termo “inflamação” deriva do latim *inflammare*, ou *inflamar*, e significa converter-se em chamas, acender ou fazer arder. É definida como a reação de defesa local dos tecidos vascularizados à agressão e ocorre como resposta inespecífica, caracterizada por uma série de alterações que tendem a limitar os efeitos da agressão, eliminando o agente irritante e reparando o tecido circundante (Greig; Kennedy; Spickett, 2012).

Dentre os sinais cardinais característicos da inflamação, rubor e calor resultam do aumento da circulação na área inflamada. O tumor aparece como consequência do aumento local do líquido intersticial (edema) e a dor, do acúmulo, no local, de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas. A perda da função é decorrente de vários fatores, especialmente edema e dor (Voltarelli, 1994).

No processo de inflamação, as células de defesa do hospedeiro, juntamente com as proteínas plasmáticas e os mediadores químicos, dirigem-se ao local da infecção ou da lesão tecidual (Koh; Dipietro, 2011). Sucede, então, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, permitindo a entrada de leucócitos e de proteínas plasmáticas no local da agressão (Balbino; Pereira; Curi, 2005).

Os leucócitos, células especializadas na defesa do organismo, são recrutados do lúmen vascular para o espaço extravascular. A sequência dos eventos do recrutamento dos leucócitos, ilustrados na Figura 2, consiste em:

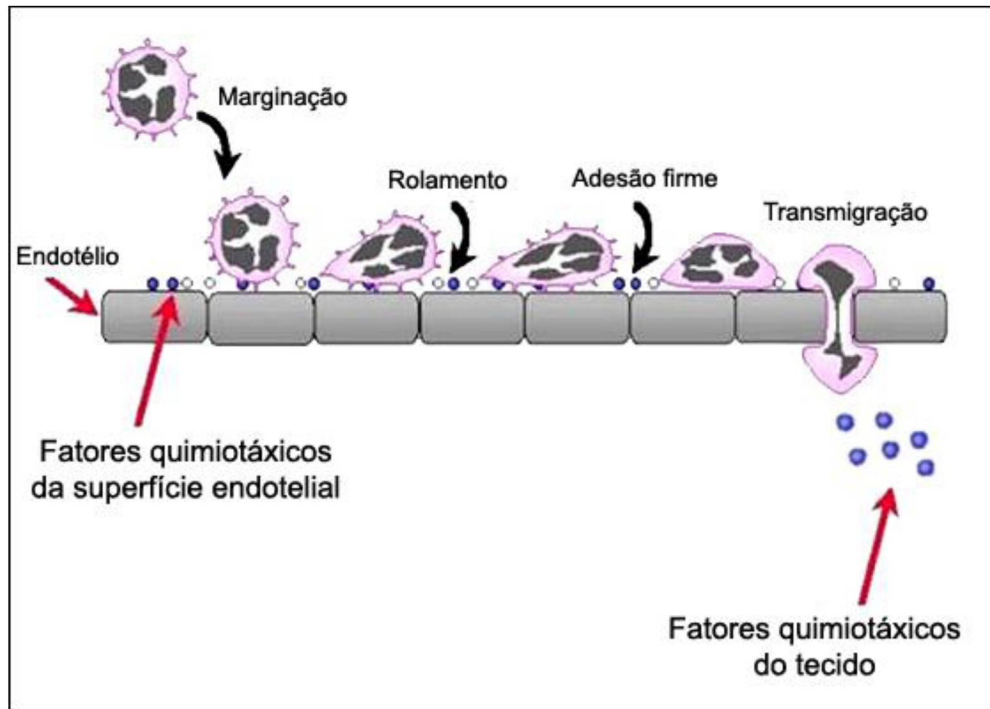


FIGURA 2 - EVENTOS LEUCOCITÁRIOS NA INFLAMAÇÃO. Durante o processo inflamatório, os leucócitos são atraídos para a área da lesão por meio de citocinas pró-inflamatórias liberadas localmente. Primeiramente, rolam e aderem-se transitoriamente ao endotélio vascular, ocorrendo, então, a diapedese; em seguida, migram em direção ao local da lesão, onde exercem suas atividades de eliminação do agente causal e cooperam na reparação do tecido lesado. FONTE: Adaptado de LEY, [S.d.].

(a) marginação, aderência ao endotélio e rolagem ao longo da parede do vaso; (b) aderência firme e transitória ao endotélio e transmigração entre as células endoteliais e (c) migração para os tecidos intersticiais, em direção a um gradiente químico (Balbino; Pereira; Curi, 2005).

Na marginação leucocitária (a), o primeiro passo em consequência das alterações do fluxo sanguíneo nas áreas inflamadas, os leucócitos se acumulam na periferia dos vasos e, subsequentemente, rolam na superfície endotelial, aderindo transitoriamente e, posteriormente, firmemente (b) às superfícies endoteliais. A diapedese ocorre em seguida, com a migração dos leucócitos pela parede do vaso,

orientada pelas quimiocinas, as quais estimulam a movimentação dos leucócitos em direção a gradientes químicos.

Após a passagem pelo endotélio, os leucócitos secretam collagenases que degradam focalmente a membrana basal dos vasos, atravessando-a. Ocorre, então, a migração dos leucócitos granulócitos (GNC), compreendendo neutrófilos, eosinófilos e basófilos, (c) em direção ao local da lesão ou infecção, ao longo de um gradiente químico (quimiotaxia) (Balbino; Pereira; Curi, 2005; Ley et al., 2007).

O processo de inflamação envolve diversos sistemas como o da cascata de coagulação e o das cininas, o sistema complemento, bem como respostas imunológicas celulares mediadas por diversos fatores como interferons, interleucinas e imunoglobulinas. Todos estes sistemas estão interligados com o objetivo de proteger o organismo contra a invasão de um agente estranho.

Diversos mediadores químicos participam destas respostas, destacando-se as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, bradicinina e histamina, além de diversos outros mediadores, como as IL-1, -6, -8 e o TNF- α (Mendonça; Coutinho-Netto, 2009; Turk, 1994).

Uma vez que tenham sido recrutados para os locais da infecção ou necrose tecidual, os leucócitos devem ser ativados para exercerem suas funções. Essas células expressam em sua superfície, diferentes classes de receptores que reconhecem o estímulo externo e liberam os sinais ativadores. Esses incluem os receptores semelhantes à Toll, que reconhecem não só a endotoxina bacteriana LPS, mas muitos outros produtos bacterianos e virais como, por exemplo, os receptores transmembrana acoplados à proteína G-7, que reconhecem certos peptídeos bacterianos contendo resíduos de formil-metil-leucil-fenilalanina (fMLP), mediadores produzidos em resposta a microrganismos, e outras famílias de receptores (Grote; Schütt; Schieffer, 2011; Jinushi, 2012; Rigby; DeLeo, 2012).

A ativação de um receptor direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de diversas atividades celulares, como a mobilização de Ca^{+2} intracelular, rearranjo do citoesqueleto, exocitose, indução da expressão de receptores de superfície, mudanças na adesão e agregação, indução da produção de superóxidos, aumento da atividade metabólica e quimiotaxia, dentre outras (Rigby; DeLeo, 2012).

A característica básica de um infiltrado inflamatório na fase aguda consiste na predominância de leucócitos polimorfonucleares tipo neutrófilo, os quais apresentam vida média circulante de 6 a 10 horas. O pioneirismo e a predominância dos neutrófilos ocorrem em razão de seu maior número dentre os leucócitos circulantes (55 a 65%) e, também, pela sua maior responsividade e agilidade de movimentação frente a fatores quimiotáticos (Rigby; DeLeo, 2012). Após 8 a 12 horas, os monócitos podem ser detectados, mas sua presença não interfere na característica celular do infiltrado inflamatório agudo, assim como a chegada de linfócitos algumas horas depois da agressão (Lingen, 2001). Portanto, o tipo de leucócito imigrante varia com o tempo da resposta inflamatória e com o tipo de estímulo.

Uma das principais funções dos neutrófilos e dos macrófagos é a fagocitose. Atraídos para o foco inflamatório, esses fagócitos procuram englobar os agentes da agressão ou outras estruturas anômalas ali encontradas (Lingen, 2001; Balbino; Pereira; Curi, 2005).

A intensidade e a evolução de um processo inflamatório serão determinadas por vários fatores relacionados ao tipo do agente agressor, tecido onde o processo está se desenvolvendo e as condições gerais do hospedeiro. A resistência e a persistência do agente agressor induzirão modificações de intensidade e características de inflamação estabelecendo-se a cronificação (Grote; Schütt; Schieffer, 2011).

A inflamação crônica é definida por uma maior infiltração de células mononucleares (MNC), abrangendo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como representação do dano tecidual perseverante. Dentre essas células, ressaltam-se os macrófagos com papel relevante, comparável ao desempenhado pelos neutrófilos na reação aguda (Cotran; Kumar; Robbins, 1994).

Em comparação ao tempo de vida média de 24 horas para os monócitos, os macrófagos permanecem por vários meses, durante os quais, ao responderem a vários estímulos, especialmente de citocinas, tornam-se ativados e capazes de exercer inúmeras funções, como proliferação, síntese, armazenamento e secreção de moléculas biologicamente ativas (enzimas proteolíticas, componentes do sistema complemento, fibronectina, fatores de coagulação, prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas, etc), operam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos, consistindo assim, como coadjuvantes indispensáveis na resposta

imunitária, gerando reagentes metabólitos do oxigênio e outras moléculas importantes para a eliminação de microorganismos, além de atuarem nos processos de reparo e regeneração tecidual (Cotran; Kumar; Robins., 1994; Butler; Harty, 2010)

Da mesma forma como ocorre com os neutrófilos, monócitos são constantemente conscritos da circulação por atenderem prontamente aos estímulos recebidos. Em compensação, todas as células implicadas nos mecanismos de defesa realizam, com aptidão, suas atribuições, amplificando o quadro inespecífico de uma resposta inflamatória persistente.

2.3.1.1 Adesão celular

A maioria das funções leucocitárias dependem da adesão celular (Gahmberg et al., 1999), não apenas para o controle da permeabilidade vascular, mas também para as propriedades intracelulares de sinalização. Este processo de adesão é uma característica primordial da arquitetura de diversos tecidos e ocorre na morfogênese, no crescimento, na organização e estabilidade teciduais, na inflamação, na resposta do hospedeiro a infecções e injúrias, na cicatrização e na resposta imunocelular (Bevilacqua et al., 1994; Golias et al., 2007; Gomes; Neto; Bispo, 2009; Maître; Heisenberg, 2011).

Organismos multicelulares possuem diferentes tecidos constituídos por células que estão em íntimo contato com uma rede complexa de macromoléculas, a MEC, a qual pode modular funções celulares (Muth et al., 2013), uma vez que proporciona suporte estrutural e mecânico para as células e tecidos, bem como, ligar-se a receptores transmembrana a fim de fornecer coordenação espacial sobre os processos de sinalização e oportunizar a adesão célula-MEC. A capacidade das células para detectar a química, a mecânica e as características topográficas da MEC lhes permite integrar a informação com o complexo multiparamétrico em uma resposta coerente com o microambiente envolvente (Byron; Humphries; Humphries, 2013).

A MEC constitui-se de uma combinação de vários tipos de proteínas e carboidratos de acordo com o tecido, tais como colágenos, fibronectina, lamininas, vitronectina, dentre outras, que possuem múltiplos sítios de interação (ou domínios),

sendo cada um específico para o acoplamento com outras moléculas da matriz ou com receptores circulantes ou presentes na superfície das células. As interações entre esse complexo proteico e fibroso, proteínas solúveis e receptores de superfície influenciam muitas propriedades das células, incluindo migração, proliferação, estágios de diferenciação e apoptose (Pereira et al., 2005).

Várias moléculas de adesão (MA) são necessárias para esse processo (Gahmberg et al., 1999). As MA envolvidas na cascata de adesão celular leucocitária são glicoproteínas presentes nos leucócitos em vesículas intracelulares e na superfície celular, e têm como função a adesão, o reconhecimento, a interação célula-célula, a coordenação da comunicação entre células e a MEC, o recrutamento e a migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação. Agem por meio de transdução de informação extracelular em organelas citoplasmáticas, o que resulta na ativação de células e produção de citocinas, tendo participação essencial na regulação da inflamação e da resposta imunitária (Bittar et al., 1999; Tanaka, 2001; Greig; Kennedy; Spickett, 2012).

As MA estão agrupadas em quatro superfamílias, dependendo de suas características moleculares, como a superfamília das imunoglobulinas, a das selectinas, a das integrinas e as caderinas (Ley et al., 2007).

As MA da família das selectinas são as responsáveis pelo início do processo de adesão celular, com adesões fracas e transitórias, embora as integrinas α_4 também possam mediar o rolamento (Kunkel; Ley, 1996; Balbino; Pereira; Curi, 2005). Os três membros da família das selectinas são a E-, P- e L-selectina, as quais acoplam-se a oligossacarídeos ligados às glicoproteínas em várias células. Elas são hiperreguladas após estimulação por mediadores específicos, como a histamina ou a trombina para a P-selectina, e mediadores inflamatórios como a IL-1 e o TNF para a E-selectina (Voltarelli, 1994; Ley, 2003).

A segunda maior classe de MA compreende a superfamília das imunoglobulinas. Alguns membros desta família participam da adesão leucocitária, principalmente por interagir com as integrinas. Destacam-se a VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, também conhecida como CD54), a ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*) (Autio; Jalkanen; Roivainen, 2013) e a ICAM-3 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-3*) (Golias et al., 2007), as quais servem como

ligantes de superfície para as integrinas LFA-1 (*Lymphocyte Function Antigen-1*) e VLA-4 (*Very Late Activation Antigen-4*) (Autio; Jalkanen; Roivainen, 2013).

A ICAM-1 é basalmente expressa em muitos tipos de células, mas a sua expressão é regulada pelas células endoteliais que exibem heterogeneidade notável entre os leitos vasculares. Os ligantes mais importantes para a ICAM-1 são as integrinas LFA-1 (também conhecida como CD11a/CD18 ou $\alpha_L\beta_2$) e Mac1 (CD11b/CD18), expressas em leucócitos. Citocinas inflamatórias aumentam a expressão de ICAM-1 em células endoteliais e ativam as integrinas leucocitárias LFA-1 e Mac-1, deste modo, ICAM-1 medeia a adesão celular em leucócitos, etapa necessária para a migração de leucócitos para o local da inflamação (Golias et al., 2007). A ICAM-1 é, provavelmente, o maior ligante para as integrinas (Gahmberg et al., 1999).

A ICAM-3 também é considerada um ligante para a integrina LFA-1. É normalmente expressa em níveis elevados em todos os leucócitos em repouso, tais como monócitos, linfócitos e neutrófilos, assim como células apresentadoras de antígenos. O seu papel ainda não é bem estabelecido, mas presume-se que aja na cascata de ativação da resposta imunitária, adesão celular e transdução de sinal por aumentar a adesão através das α e β integrinas (Golias et al., 2007). Contudo, parece ser mais importante como um componente de sinalização celular (Gahmberg et al., 1999).

A VCAM-1 apresenta baixa ou insignificante expressão em células endoteliais não estimuladas, mas é ativada por citocinas e mediadores inflamatórios, tais como IL-1, IL-4, CD44, TNF e IFN- γ . Sua maior fixação ocorre através do ligante VLA-4 (Golias et al., 2007).

A etapa de adesão firme e duradoura é mediada pelas integrinas com interação à superfamília das imunoglobulinas. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembrana, de cadeias α e β (Bittar et al., 1999; Balbino; Pereira; Curi, 2005) com 120-170 kDa e 90-100 kDa de tamanho, respectivamente. Contêm sítios de ligação para os cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} , necessários para a sua função adesiva (Ley et al., 2007). São descritas vinte e quatro subunidades α e nove subunidades β , com um segmento transmembrânico hidrofóbico único, com especificidade para interações e ligações com componentes da MEC e ligantes de superfície celular, formando 25 subunidades $\alpha\beta$ (Bittar et al., 1999; van der Flier;

Sonnenberg, 2001; Pereira et al., 2005; Li et al., 2009). Esta ampla gama de subunidades contribui para a diversidade no reconhecimento do ligante, ligação com os componentes do citoesqueleto e acoplamento dos caminhos de sinalização (Luo; Carman; Springer, 2007).

É pertinente destacar que cada receptor $\alpha\beta$ reconhece um ou mais ligantes e a especificidade de ligação de um determinado receptor pode ser afetada pelo ambiente ou pelo estado de ativação. Desta maneira, a expressão de uma integrina não implica necessariamente em um papel funcional na adesão. Muitas vezes, elas precisam ser ativadas por mediadores solúveis, como hormônios, citocinas ou por componentes proteicos da MEC (Hynes, 1992; Springer, 1994; Lampugnani; Dejana, 1997) para, então, aumentar sua afinidade e interagir com o ligante.

Na interação entre as proteínas da MEC, mais especificamente a fibronectina e a vitronectina, com as integrinas, a sequência proteica Arginina-Glicina-Asparagina (RGD) acopla-se às moléculas $\alpha_5\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5, *Very Late Activation Antigen-5*; CD49e), $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_3\beta_1$ e a sequência ácido glutâmico-isoleucina-leucina-asparagina-valina (EILDV) interage especificamente com a integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4; CD49d/CD29), bem como a sequência leucina-ácido-aspártico-valina (LDV) (Yusuf-Makagiansar et al., 2002). A integrina VLA-4 é um receptor de superfície celular para a fibronectina e para VCAM-1 (Garmy-Susini et al., 2010). Lamininas e colágenos também contém sequências RGD, mas essas normalmente estão encriptadas e inacessíveis (van der Flier; Sonnenberg, 2001).

As integrinas β_1 , também conhecidas como VLA (*Very Late Activation Antigens*), contém seis cadeias α diferentes (VLA-1 a VLA-6) associadas com uma cadeia β comum que funcionam como receptores para proteínas da MEC como a fibronectina, o colágeno e a laminina. Entre as diferentes cadeias, VLA-4 é a principal molécula envolvida na adesão leucocitária ao endotélio. É expressa em linfócitos não ativados, em monócitos, bem como em linhagens celulares B e T. Ligantes para VLA-4 incluem, principalmente, a VCAM-1 e fibronectina da MEC via EILDV (Laffón et al., 1991; Carlos; Harlan; 1994). Do mesmo modo, VLA-5 é o maior receptor celular para a fibronectina. Sua interação ocorre usando o sítio RGD descrito anteriormente (Nagae et al., 2012). Como função, é fundamental para o desenvolvimento dos mamíferos e sua deficiência resulta em letalidade embrionária

precoce (Takagi et al., 2003). Sun, Pitson e Bonder (2010) demonstraram que o TNF ativa a integrina VLA-5 sem alterar seus níveis de expressão.

Conforme demonstrado, no desenvolvimento de inflamação o processo de recrutamento de leucócitos é altamente regulado pela expressão sequencial e ativação de MA específicas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais. Entretanto, não se tem conhecimento até o momento, de estudos correlacionando CPP com a expressão de MA em leucócitos periféricos e a sua função adesiva. Dessa forma, tornou-se alvo de nosso interesse investigar o efeito de CPP nos níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em diferentes populações de leucócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

2.3.1.2 Quimiotaxia

O termo quimiotaxia foi introduzido por Wilhelm Friedrich Phillip Pfeffer, em 1884, que o descreveu como a migração direcional dos leucócitos ao longo de um gradiente (Wilkinson; Haston, 1988; Wilkinson, 1998). Esta migração, assim como a adesão, em muitos eventos biológicos, como na embriogênese, no desenvolvimento da resposta imunológica, na cicatrização de feridas, na inflamação e na infecção (Snyderman; Goetzl, 1981; Byrne; Cave; McElwain, 1998; Chung; Funamoto; Firtel, 2001; Jin; Hereld, 2006; Kim; Peyton, 2011).

O movimento celular direcional a favor (quimiotaxia positiva) ou contra (quimiotaxia negativa) um gradiente químico é comum a várias células eucarióticas e, no caso particular dos leucócitos, é o mecanismo pelo qual essas células se acumulam no sítio inflamatório (Wilkinson, 1996).

O movimento celular direcional envolve a polimerização de actina filamentosa diferencial de uma célula, levando a protusão da superfície da membrana. Em seguida, há contração posterior da célula mediada pela miosina II, que resulta na formação de pseudópodes, impulsionando a célula para frente. Os membros da família Rho (Rho-GTPases) e proteínas G são reguladores chave do citoesqueleto da actina e miosina II e encontram-se acoplados nas células para detecção dos quimioatraentes (Chung; Funamoto; Firtel, 2001; Kim; Peyton, 2011).

Esse movimento celular requer uma polaridade celular definida em que os componentes do citoesqueleto são diferencialmente localizados em dois pólos da célula (Chung; Funamoto; Firtel, 2001; Kim; Peyton; 2011). A direção desse movimento é especificada pela alta densidade de interações entre um ligante quimiotático e o seu receptor na margem dianteira da célula, enquanto a força contrátil na cauda da célula permite a migração celular (Kim; Peyton, 2011; Theveneau et al., 2010). Um modelo de polarização de células na quimiotaxia é apresentado na Figura 3.

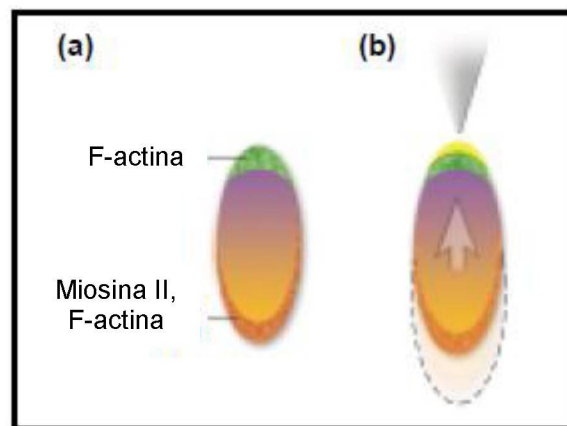


FIGURA 3 - MODELO DE QUIMIOTAXIA DE CÉLULAS POLARIZADAS PARA UM FORTE ESTÍMULO DIRECIONAL. Células polarizadas apresentam uma localização diferencial de F-actina e miosina II (a); Células atraídas por quimioatraentes e movimentação até um gradiente de concentração quimioatraente (b). F-actina: actina filamentososa. FONTE: adaptado de Chung; Funamoto; Firtel (2001).

Substâncias quimioatraentes estabilizam saliências na frente das células, criando uma assimetria e levando à migração direcional do grupo celular (Theveneau et al., 2010).

O sinal quimiotático liberado dessa interação é o adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc), mensageiro intermediário que ativa vias específicas com consequente aumento da polimerização de actina na linha de frente, em direção ao sinal. Na sua forma molecular monomérica, a actina é solúvel, mas quando polimerizada produz filamentos insolúveis de considerável força mecânica. As miosinas interagem com filamentos de actina e convertem a energia química do

trifosfato de adenosina (ATP) em trabalho mecânico, resultando na tração e movimento celulares (Chung; Funamoto; Firtel, 2001).

Quimioatratores ou fatores quimiotáticos são moléculas geralmente pequenas, solúveis em água, que funcionam como ligantes para receptores de superfície celular, ativando vias de sinalização e levando à montagem localizada de actina filamentosa (F-actina). Agem de duas maneiras distintas: ou aumentam o movimento aleatório de células (quimiocinese) ou induzem o movimento celular polarizado em direção a um gradiente químico (quimiotaxia) (Byrne; Cave; McElwain, 1998; Chung; Funamoto; Firtel, 2001).

Substâncias exógenas e endógenas podem atuar como fatores quimiotáticos para os leucócitos e incluem produtos bacterianos, particularmente os peptídeos *f*-MLP, a caseína, as citocinas, especialmente as pertencentes à família das quimiocinas (IL-8, TNF- α , IFN- γ); componentes do sistema complemento, em particular o C5a, e produtos da via da lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, como o leucotrieno B₄ (LTB₄) e o fator de ativação plaquetário (PAF). A infiltração de leucócitos no local de lesão ou infecção resulta de ações das várias combinações de mediadores (Jin; Hereld, 2006).

Ensaio *in vitro* para o estudo de quimiotaxia foram desenvolvidos nas últimas três décadas, começando com simples estudos de migração celular em superfícies de vidro na presença de fatores solúveis. A migração em Câmaras de Boyden foi o mais notável avanço em ferramentas desenvolvidas para o estudo de fatores quimioatratores, onde a invasão celular é mensurada através de uma matriz porosa para um fator quimioatrator (Boyden, 1962). Nenhuma degradação da matriz é necessária para a invasão, mas o tamanho dos poros da matriz podem variar para avaliar o efeito de barreira estérica (Kim; Peyton, 2011).

Os neutrófilos, devido ao seu núcleo polilobulado, ultrapassam poros de 5 μ m de diâmetro, muito menores que o seu tamanho, portanto, possuem a habilidade de se comprimir e passar através do pavimento de células endoteliais (diapedese) e continuar migrando em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia, rearranjam seu citoesqueleto e fagocitam microorganismos (Chung; Funamoto; Firtel, 2001). Além disso, frequentemente ocorre degranulação e ativação da fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase, gerando metabólitos tóxicos do oxigênio (Bokoch, 1995).

Assim como não há relatos da influência de CPP na função adesiva, foi nosso interesse estudar os efeitos que os CPP poderiam exercer sobre a atividade quimiotática de granulócitos periféricos humanos, no sentido de serem moduladores da resposta inflamatória.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck ou Sigma, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q. As soluções foram preparadas e em seguida esterilizadas (1) por calor úmido (autoclave a 121°C, 15 min, 1 atm) ou (2) por filtração (membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro) e, posteriormente, foram armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente – T.A., 4 a 8°C – geladeira, ou a –25°C), ao abrigo de luz, conforme indicado. Os ensaios em condições de esterilidade foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical TROX modelo FLVQ TAM 12.

3.1.1 Solução de acrilamida 30%

Acrilamida 29,2% e N'N'bis-metileno-acrilamida 0,8% foram dissolvidos em água e a solução conservada à 4°C.

3.1.2 Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e Tampão Tris-HCl 1M pH 6,8

Quantidade apropriada de Tris-base foi dissolvido em água, o pH ajustado com solução de HCl 6N, e as soluções armazenadas a 4°C.

3.1.3 Gel de corrida (20 mL)

Água 1,4 mL; Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 5 mL; 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 200 µL; acrilamida 30%, 13,4 mL; persulfato de amônio 10%, 100 µL; TEMED, 20 µL.

3.1.4 Gel de alinhamento

Água 4,1 mL; Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, 750 µL; acrilamida 30%, 1,0 mL; 10% SDS, 60 µL; persulfato de amônio 10%, 60 µL; TEMED, 6 µL.

3.1.5 Tampão de carregamento das amostras 2X (10 mL)

SDS 4%, 4 mL; glicerol 20%; 2-mercaptoetanol 10%; 1 M Tris-HCl pH 6,8, 1,25 mL; azul de bromofenol 1%, 80 µL; água 1,75 mL.

3.1.6 Tampão de corrida

Tris-HCl 3,03% (p/v), glicina 14,4% (p/v) e submetido a condições desnaturantes, sendo acrescentado, para tal, de SDS 0,1% (p/v).

3.1.7 Solução corante de gel

Comassie Brilliant Blue R-250 0,05% (p/v) foi dissolvido em metanol 50% e adicionado de ácido acético 10% e água 40%. A solução foi mantida em temperatura ambiente.

3.1.8 Solução descorante de gel

Metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água *q.s.p.* 100 mL.

3.1.9 Marcador de Peso Molecular

O Broad Range Markers (SC-2361, Santa Cruz Biotechnology, Inc®), composto por miosina (200 kDa), fosforilase b (97k Da), soro fetal bovino (66 kDa), ovoalbumina (44 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), mioglobina (17 kDa), lisozima (14 kDa) e aprotinina (6 kDa), foi usado como marcador de peso molecular.

3.1.10 Solução de Re-secagem

Etanol:água:triethylamina 2:2:1 (v/v).

3.1.11 Reagente de Derivatização

Etanol: triethylamina:água: Fenilisotiocianato (PITC), 7:1:1:1(v/v).

3.1.12 Solução diluente para CLAE

Tampão fosfato de sódio (pH 7,4) com acetonitrila (95:5) (v/v).

3.1.13 Solução padrão de aminoácidos para análise por CLAE

A solução padrão comercial utilizada (Pierce®) contém 2,5 μMol de cada um dos seguintes aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), serina (Ser), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), e 1,25 μMol de cisteína (Cys).

3.1.14 Solução salina fisiológica

Cloreto de sódio 150 mM em água.

3.1.15 Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)

Solução tamponada com fosfatos foi preparada dissolvendo-se $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (150 mM), Na_2HPO_4 (150 mM) e NaCl (154 mM) em água. Após ajuste do pH para 7,2–7,4 com solução de NaOH 1 N, a solução foi esterilizada em autoclave e armazenada em geladeira.

3.1.16 Solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v)

Azul de Trypan em solução salina tamponada com fosfatos.

3.1.17 PBS suplementado (PBSS)

PBS foi suplementado, em condições assépticas, na hora do uso, com soro albumina bovina (BSA) 0,25% (p/v), glucose 0,1% (p/v), CaCl_2 (0,9 mM) e MgCl_2 (0,5 mM).

3.1.18 Solução hemolisante de eritrócitos

Solução de lise de eritrócitos foi preparada 10x concentrada: NH_4Cl 80,2 g; NaHCO_3 8,4 g; EDTA- NA_2 3,7 g; água *q.s.p.* 1 L. A solução de uso foi diluída em água, esterilizada por filtração e armazenada a 4°C.

3.1.19 Solução de caseína a 5% (p/v)

Caseína em pó foi dissolvida em PBSS (50 mg/mL), fracionada em alíquotas e armazenada à menos 10°C. Foi descongelada apenas na hora do uso.

3.1.20 Solução de caseinato de sódio a 5% (p/v)

Caseinato de sódio em pó foi dissolvido em PBSS (50 mg/mL), fracionado em alíquotas e armazenado à menos 10°C. Foi descongelado apenas na hora do uso.

3.1.21 Soluções de CPP a 5% (p/v)

Caseinofosfopeptídeos foram dissolvidos em PBSS (20 mg/mL), fracionados em alíquotas e armazenados à menos 10°C. Foram descongelados apenas na hora do uso.

3.1.22 Solução de paraformaldeído 1% (p/v)

Paraformaldeído foi dissolvido em PBS sob aquecimento constante à 45°C e conservado à 4°C.

3.1.23 Solução reagente do complexo Molibdênio

Fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL), ácido sulfúrico 3M (20 mL) e água *q.s.p* 100 mL.

3.1.24 Soluções reagentes para avaliação de espécies reativas no Ácido Tiobartitúrico (TBA)

TBA 0,4% em SDS; Cloreto de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) (ABAP) 0,035%; 500 µL de solução de gema de ovo em SDS.

3.2 OBTENÇÃO DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS

Para obtenção dos CPP utilizou-se caseinato de sódio bovino (LACTONAT HV, *Lactoprot Deutschland GmbH*) como matéria-prima, gentilmente cedido pela empresa *Lactoprot Deutschland GmbH*, Alemanha. Os peptídeos foram produzidos por hidrólise trípica do caseinato de sódio, seguida de precipitação ácida, agregação mineral e precipitação com etanol conforme metodologia de Adamson e Reynolds (1995) com algumas modificações, conforme Figura 4. Dissolveram-se 228,57 g de caseinato de sódio bovino em 2 L de água deionizada para produzir,

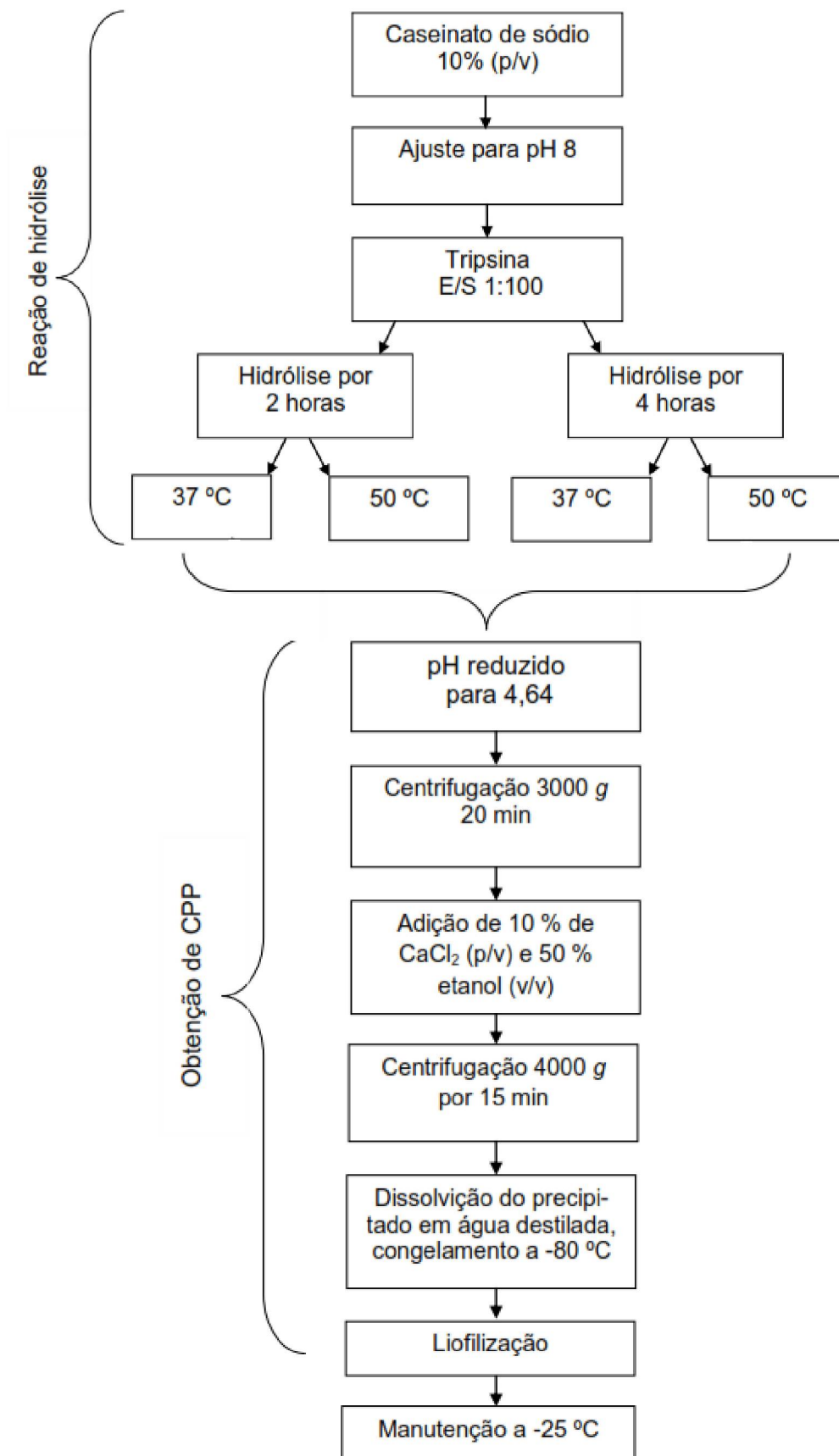


FIGURA 4 - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CASEINOFÓFOPEPTÍDEOS

aproximadamente, uma solução a 10% de proteínas (p/v). O pH inicial de 6,38 da solução foi ajustado para 8 com NaOH 2 mol/L e tripsina (PTN 6.0) na proporção E/S 1:100 dissolvida em água foi adicionada. Realizaram-se quatro tratamentos envolvendo tempo de hidrólise e diferentes temperaturas. A hidrólise foi realizada por 2 e 4 horas, sob leve e constante agitação, a 37°C e a 50°C. O pH 8,0 foi mantido durante todo o procedimento, segundo o método de pH-stat (Adler-Nissen, 1986). Após hidrólise, reduziu-se o pH para 4,64 com HCl 2 mol/L. O precipitado insolúvel que se formou foi removido por centrifugação a 3000 g por 20 min. De acordo com o volume do sobrenadante, foram adicionados 10% de CaCl₂ (p/v) e 50% de etanol (v/v), com o objetivo de promover a agregação do mineral ao peptídeo e sua precipitação. O precipitado resultante foi coletado por centrifugação a 4000 g por 15 min. Após dissolução do precipitado em água, o produto foi congelado à -80°C, submetido à liofilização e, em seguida, mantido congelado à -25°C até o momento de uso.

3.2.1 Avaliação da composição centesimal

A determinação de nitrogênio proteico foi realizada pelo método semi-micro Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,38 para conversão em proteína (AOAC, 1990). O teor de cinzas foi determinado pelo método de incineração em mufla a 550°C até peso constante (AOAC, 1990). A umidade foi mensurada pelo meio de secagem em estufa com circulação de ar forçada à 105°C até peso constante (AOAC, 1990). Os teores de cálcio, fósforo e sódio foram determinados por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICPOES) (CEPPA, 2012).

3.2.2 Caracterização dos CPP por Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE)

Análise das frações de CPP foi realizada por meio de eletroforese em gel de poli(acrilamida) a 20% em condições desnaturantes, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). As frações proteicas foram aplicadas nas seguintes

concentrações em termos de proteínas totais: 300 µg de CPP; 50 µg de BSA, de caseinato de sódio e de caseína bovina. Após adição de *q.s.* do gel de carregamento, as amostras foram aquecidas a 98°C por 5 minutos e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V para alinhamento das amostras, e em 200 V para a separação das bandas proteicas. Como marcador de peso molecular (M) utilizou-se o *Broad Range Markers* sc-2361 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após a corrida, o gel foi, então, submerso em solução fixadora por 15 minutos, sob constante agitação. Em seguida, foi corado com solução de Azul de Coomassie até o aparecimento das bandas (3-4 horas) e descorado com sucessivas trocas de solução descorante até obtenção de um gel com bandas nítidas em um fundo claro.

3.2.3 Análise dos CPP por infusão direta em espectrômetro de massas (DMIS)

3.2.3.1 Instrumentação e condições de análise

Os experimentos por DIMS foram conduzidos em um EM do tipo triplo quadrupolo modelo API 3200 (Applied Biosystems) equipado com uma bomba seringa modelo Harvard 22 Dual (Harvard Apparatus) e uma fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). A fonte foi operada no modo positivo, mantendo a posição do capilar em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal. A bomba seringa operou em velocidade de 10 µL/min. Os parâmetros ajustados manualmente no equipamento para estabilização do sinal foram voltagem do capilar (IS): 4 kV; potencial de entrada no cone EP: 10 eV; potencial de desagrupamento (PD): 40 eV; gás de Interface (CUR): 10 psi; gás de nebulização (GS1): 15 psi e temperatura: 200°C. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR e GS1 foi produzido por um gerador de nitrogênio (*Peak Scientific Instruments*). Os espectros de massas foram adquiridos em 5 min de varredura entre 100 a 1800 Daltons (Da) acumulando 100 ciclos de 3 segundos. A aquisição dos dados foi obtida com o programa Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

3.2.3.2 Preparo de amostras

Em tubos de polipropileno foram preparadas soluções de CPP liofilizados a uma concentração de 0,2% utilizando como solvente água acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) (v/v) (Miquel et al., 2006). As amostras foram homogeneizadas em agitador (Phoenix®) por 1 minuto e, em seguida, filtradas com filtros contendo 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex-HV®, PVDF Durapore, Millipore, Estados Unidos). As amostras foram imediatamente submetidas aos experimentos de DIMS, sendo as análises realizadas em triplicata. Os espectros de massas da água contendo 0,1% de TFA foram adquiridos e considerados como branco.

3.2.3.3 Análises quimiométricas

Os espectros de massas obtidos com as amostras foram subtraídos daqueles obtidos com injeções de um branco (água acidificada com 1,1% de ácido trifluoracético, v/v). Análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando PLSToolbox 3.0 (*Eigenvektor Research*) operado no software Matlab 7.0.1® (Mathworks). Para as análises de PCA – *Principal Component Analysis*, os dados correlacionando massa/carga (m/z) e intensidade de sinal (%) foram organizados no programa Excel 2007 (Microsoft) para comporem a matriz X. Em seguida, os dados foram exportados para o programa Matlab, e o pré-processamento utilizado para a análise do conjunto de dados foi centragem na média. O número de componentes principais (PC) para comporem a análise foi escolhido em função do gráfico que correlaciona autovalores (*Eigenvalues*) versus número de PC. Escolhidos os PC, foram plotados os gráficos de *scores* com o objetivo de distinguir grupos de amostras similares e os gráficos de *loadings* para verificar os sinais responsáveis pela distinção entre estes grupos.

3.2.4 Determinação e quantificação dos aminoácidos hidrolisados dos CPP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (Sigma Aldrich), previamente filtrados em membrana de 0,45 μM (Millipore). Utilizou-se água para os eluentes. O sistema cromatográfico analítico utilizado foi um cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom, composto de bomba quaternária L-7100, injetor automático L-7250, detector ultravioleta visível (UV-Vis) com varredura espectral L-7455 e módulo de aquecimento de colunas L-7300. Os resultados foram obtidos com auxílio do programa Merck HSM, versão 4.1. Foi utilizada coluna Nova-Pak C-18 (150 mm x 3,9 mm d.i.), com partículas de 4 μM (Waters) a qual foi mantida na temperatura de 35°C. Os CPP foram eluídos conforme Tabela 1. O eluente A consistiu de tampão acetato pH 6,4 e acetonitrila na proporção 94:6 (v/v), e o eluente B, acetonitrila:água a 60:40 (v/v).

TABELA 1 - TEMPO E VAZÃO DE ELUENTES NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE, PARA SEPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DE CASEINOFOSFOPEPTIDEOS

Tempo Inicial	Vazão (mL/min)	% de Eluente A	% de Eluente B
10,0	1,0	100	0
10,5	1,0	54	46
11,5	1,0	0	100
12,0	1,5	0	100

3.2.4.1 Reação de Hidrólise dos CPP

Foi utilizada como referência a metodologia de Heinrikson e Meredith (1984). Para tanto, 20 μL de solução aquosa a 1% de cada amostra de CPP foram secas em aparelho Pico Tag®. A reação de hidrólise foi realizada por 24h a 105°C sob vácuo, em presença de vapores de nitrogênio e ácido clorídrico 6 mol/L com 1% de fenol e na ausência de oxigênio. Após a hidrólise, foram adicionados 10 μL de solução de

re-secagem nas amostras para eliminação de resíduos ácidos. Após nova secagem procedeu-se a derivatização com PITC adicionando-se 20 μ L de reagente recentemente preparado e deixado em repouso por 20 minutos em T.A. Em seguida, as amostras foram secas e dissolvidas em 200 μ L de solução diluente para análise por CLAE. A solução padrão contendo vários aminoácidos foi submetida ao mesmo procedimento experimental.

3.2.4.2 Análise de Aminoácidos

A separação dos aminoácidos foi realizada por CLAE utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 com monitoração em 254 nm. A identificação e a quantificação de cada aminoácido foi baseada no tempo de retenção e na área do pico, tomando-se como referência esses mesmos parâmetros obtidos para cada aminoácido contido na solução padrão, conforme item 3.1.13.

3.3 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos saudáveis, maiores de 20 anos, de ambos os sexos e sem uso de medicações nos últimos 10 dias. Consentimento livre e esclarecido dos voluntários saudáveis foi obtido após aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob registro CEP/SD nº 1265.190.11.11, em dezembro de 2011 (ANEXO A). Foram obtidos 20 mL de sangue por punção venosa e acondicionados em frascos estéreis contendo heparina sódica.

3.3.1 Separação das populações de leucócitos humanos para ensaios de expressão de moléculas de adesão

Sangue anticoagulado foi centrifugado a 200 g por 10 min a T.A. O plasma rico em plaquetas foi eliminado e o volume original reconstituído com PBS. Nova

centrifugação a 800 *g* por 25 min permitiu a separação do creme leucocitário (0,5-1,5 mL), o qual foi ressuspensão em *q.s.p.* 10 mL de PBS e adicionado carboximetilcelulose (CMC) a 1%. Após homogeneização, as amostras ficaram em repouso, a T.A., por uma hora. A fração superior, rica em leucócitos, foi então, transferida para tubo cônico contendo 10 mL de solução hemolisante. Após 8 minutos, os leucócitos foram lavados duas vezes com PBS (400 *g* por 5 min), ressuspensos em PBS suplementado (PBSS), enumerados com o auxílio de um hemocítmetro e sua concentração igualmente ajustada para 10⁶ células/mL. Somente amostras contendo ≥90% de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

3.3.2 Separação das populações de leucócitos humanos para ensaios de quimiotaxia

Células mononucleares (linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação em condições de esterilidade, usando-se o gradiente de densidade Ficoll-PaqueTM PLUS 1,077 g/cm³ (Amersham, Biosciences). Após centrifugação a 200 *g* por 10 min a T.A., o plasma rico em plaquetas foi retirado e o volume original reconstituído com PBS. Nova centrifugação a 800 *g* por 25 min permitiu a separação do creme leucocitário (0,5-1,5 mL), o qual foi ressuspensão em *q.s.p.* 10 mL de PBS e gentilmente depositado sobre Ficoll-Paque (3 ml). Após centrifugação de 400 *g* por 30 min em T.A., os GNC recuperados do sedimento após lise dos eritrócitos com solução hemolisante foram recuperados conforme já descrito.

3.3.3 Viabilidade celular

A viabilidade dos leucócitos foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste com Azul de Trypan (Merchant; Kahn; Murphy, 1964). Populações de leucócitos isoladas como descrito anteriormente foram diluídas apropriadamente em solução de Azul de

Trypan 0,4% e sua viabilidade observada ao microscópio óptico (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as células não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno.

3.3.4 Ensaios de citotoxicidade da caseína, caseinato de sódio e dos CPP

Para avaliação do efeito tóxico da caseína, do caseinato de sódio e dos CPP, concentrações crescentes de cada um deles (0,01% a 5%) foram adicionadas a 10^6 células (GNC) e incubadas a 37°C por duas horas (para GNC) em PBSS. Em seguida, as células foram observadas quanto à viabilidade como descrito no item 3.4.2. Cada experimento foi realizado em triplicata e, para o resultado, utilizou-se a média dos experimentos.

3.4 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO EM LEUCÓCITOS

Leucócitos humanos (5×10^5 células/mL) ressuspensos em PBSS foram incubados com as diferentes frações de CPP a 1% (p/v), por 1 hora, a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e adicionadas de 10 μ L de solução de anticorpos monoclonais conjugados à ficoeritrina (PE) para VLA-4 (Pharmingen/BD) ou anticorpos monoclonais conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) para VLA-5 (Immunotech) ou, ainda, de LFA-1 (Pharmingen/BD). A mistura foi incubada ao abrigo da luz por 15 min, a 37°C. As células marcadas foram, em seguida, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 0,5 ml de solução de paraformaldeído 1% (p/v). Os níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 foram analisados em um citômetro de fluxo Becton & Dickinson, modelo FACS Calibur, equipado com laser Argônio 488 nm. Em todas as determinações citométricas, um mínimo de 10^4 células foi analisado e a linha limite de detecção baseou-se na máxima coloração obtida com a mesma população, porém sem estar tratada com peptídeos. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata.

3.5 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS

A quimiotaxia dos GNC foi observada em câmaras de Boyden, conforme metodologia de Boyden (1962). Granulócitos humanos (10^6 células) separados por gradiente de densidade e ressuspensos em PBSS (200 μ L) foram adicionados ao compartimento superior da câmara de Boyden e estimulados a migrar contra gradientes de diferentes frações de CPP, de caseína (usada como modulador positivo) e de caseinato de sódio, depositados no compartimento inferior. Filtros de policarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Nuclepore, Neuroprobe), com poros de 5 μ m de diâmetro, foram usados para separar os compartimentos. As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por 90 min e o número de leucócitos que migrou ativamente para o compartimento inferior foi enumerado com o auxílio de um hemocitômetro de Neubauer Improved. O monitoramento da migração espontânea dos leucócitos (controle) foi realizado com adição de PBSS no compartimento inferior da câmara, conforme ilustrado na Figura 5. Os resultados foram expressos como a porcentagem média de células recuperadas do compartimento inferior das câmaras em relação aos resultados obtidos para a caseína, utilizada como controle positivo.

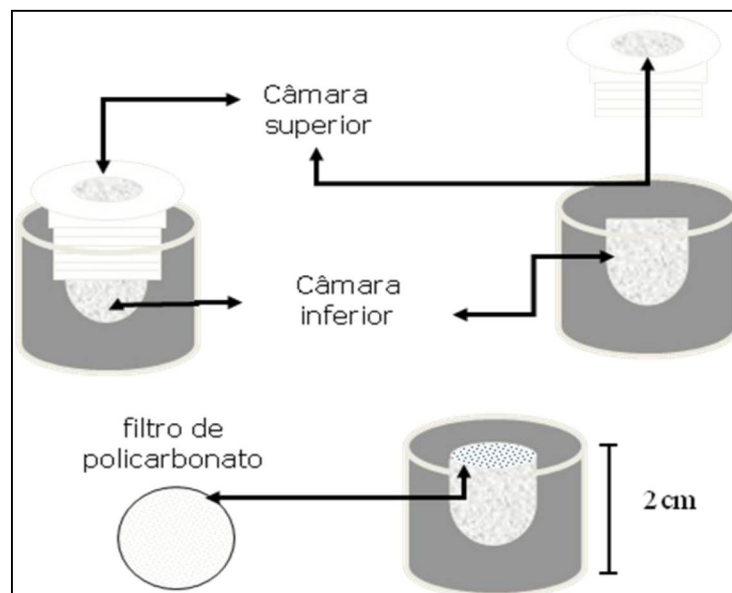


FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DA CÂMARA DE BOYDEN UTILIZADA PARA OS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos CPP, bem como a do caseinato de sódio, foi investigada usando cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e de isolado clínico de *Salmonella enteritidis*.

3.6.1 Reativação dos microorganismos

Cepas de bactérias mantidas a -20°C em TSB (*Trypticase Soy Broth*)/glicerol 20% foram descongeladas, inoculadas em Ágar Cled e incubadas à 36°C por 24h. Colônias isoladas foram, então, individualmente inoculadas em meio TSA (*Trypticase Soy Agar*) inclinado e re-incubadas a 36°C por 24h e mantidas em geladeira por até 4 semanas. A partir do meio TSA, foram feitos subcultivos em Ágar MacConkey para ambas as cepas. Após 24h de incubação à 36°C , 10 a 15 colônias isoladas de cada bactéria foram transferidas para frascos contendo salina estéril e a concentração bacteriana ajustada de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

3.6.2 Teste de Microdiluição em Caldo

O teste de microdiluição em caldo foi realizado segundo metodologia descrita por Woods e Washington (1995), onde suspensões bacterianas, na concentração equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, foram diluídas 1:10 em salina estéril (concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ UFC/mL). Aliquotas de 5 μL (aproximadamente $7,5 \times 10^4$ UFC) de cada suspensão bacteriana foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços estéreis, contendo soluções estéreis dos 4 tipos CPP e de caseinato de sódio à 2% (p/v) em meio Mueller-Hinton Broth, distribuídos previamente nas placas, por meio de diluição seriada decrescente (2 à 0,25%). O controle consistiu de todos os componentes com exceção dos CPP e/ou caseinato de sódio. As placas foram, então, incubadas a 36°C por 18 h. O crescimento

bacteriano foi avaliado pelo aumento na absorvância em 620 nm (A_{620}) após o período de incubação, para a qual o valor de 100% foi atribuído a $A_{620\text{nm}}$ das culturas controle. Cada teste foi realizado em triplicata e o resultado corresponde a duas séries de testes independentes.

3.7 ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante dos CPP e do caseinato de sódio foi avaliado por dois métodos: redução do complexo fosfomolibdênio e determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.7.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

Para realização desse ensaio foi utilizada a metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Soluções aquosas dos diferentes CPP e caseinato de sódio (200 $\mu\text{g/mL}$, 0,3 mL) foram adicionados de solução reagente do complexo fosfomolibdênio (3 mL) e incubados por 90 min a 95°C. Após resfriamento, procedeu-se a leitura em espectrofotometria a 695 nm para obtenção das absorvâncias (A). Foram utilizados metanol (0,3 mL) e reativo (3 mL) como branco. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação ao ácido ascórbico e a rutina, dois padrões com conhecida atividade antioxidante e, para os quais foi atribuído o valor 100%, de acordo com as equações:

AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C	ARR% EM RELAÇÃO À RUTINA
$\frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{vitamina C}} - A_{\text{branco}}} \times 100$	$\frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{rutina}} - A_{\text{branco}}} \times 100$

Onde AAR%: Percentual de atividade antioxidante relativa; A: absorvância em 695 nm.

3.7.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este experimento foi realizado conforme metodologia de Hodges et al. (1999). Para o preparo da fonte de lipídeos foi utilizada gema de ovo (5 g) previamente separada

da clara, filtrada e solubilizada em solução SDS (100 mL). Em frasco apropriado foram adicionados 400 µL de água destilada, 100 µL de amostra (3 mg/mL), 50 µL de ABAP, 500 µL de solução de gema de ovo, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% e 1,5 mL de solução de TBA. A solução preparada foi submetida ao banho-maria a 95°C por 60 min. Após resfriamento, adicionou-se aos tubos, 1,5 mL de n-butanol e, após homogeneização, foram centrifugados a 5.000 *rpm* por 3 min e a absorvância dos sobrenadantes obtida em 532nm. O mesmo processo foi realizado com tubos controle, nos quais foram adicionados todos os reagentes exceto as amostras, que foram substituídas por 100 µL de metanol. O branco da amostra foi preparado substituindo o ABAP por 50 µL de água. Como padrões, foram utilizados butil hidroxi tolueno (BHT), vitamina E, vitamina C e o flavonoide quercetina. A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA), obtido em porcentagem de acordo com a fórmula:

$$\text{IAA (\%)} = 1 - \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde: IAA: índice de atividade antioxidante; A: absorvância em 532 nm.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média ± desvio padrão (DP). Para análise estatística dos resultados, foi utilizado teste t e Análise de Variância (ANOVA – *one way*). O teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey, quando apropriado. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa *SPSS Statistics 17.0* e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.9 REFERÊNCIAS – FORMATAÇÃO

As referências deste trabalho foram formatadas utilizando-se o Programa *Mendeley*.

4 RESULTADOS

Como a base molecular da funcionalidade de proteínas alimentares é relacionada aos seus atributos intrínsecos envolvendo tamanho e composição de aminoácidos, bem como suas características físico-químicas (Léonil et al., 2000) e a incorporação de fragmentos proteicos está cada vez mais presente na alimentação humana, este trabalho foi dedicado ao estudo da composição e do potencial biológico de CPP obtidos da fragmentação enzimática controlada de caseinato de sódio comercialmente disponível.

Dessa forma, foram produzidas quatro frações de CPP a partir da digestão com tripsina, os quais diferiram entre si pelo tempo de hidrólise (2 e 4 horas) e pelas temperaturas empregadas (37°C e 50°C) para digestão. Essas frações, doravante nominadas 2h/37°C, 2h/50°C, 4h/37°C e 4h/50°C foram, então, caracterizadas do ponto de vista físico-químico. Em seguida, suas propriedades nas respostas inflamatória, antibacteriana e antioxidante foram investigadas em ensaios *in vitro* clássicos, cujos resultados estão descritos a seguir.

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS

4.1.1 Avaliação da composição centesimal

O procedimento de precipitação seletiva envolvendo a adição de CaCl_2 e etanol em pH 4,6 durante a hidrólise triptica do caseinato de sódio resultou em precipitados de aspecto físico característico, ilustrados na Figura 6 antes do congelamento (Figura 6-A) e após a liofilização (Figura 6-B), correspondendo a 25,83% de rendimento para o CPP 2h/37°C, a 13,28% para o CPP 2h/50°C, a 13,42% para o CPP 4h/37°C e, 12,81% para o CPP 4h/50°C. A fração 2h/37°C destacou-se por apresentar rendimento mais elevado em relação aos demais devido, provavelmente, às condições mais brandas empregadas, ou seja, menor tempo e temperatura de reação.

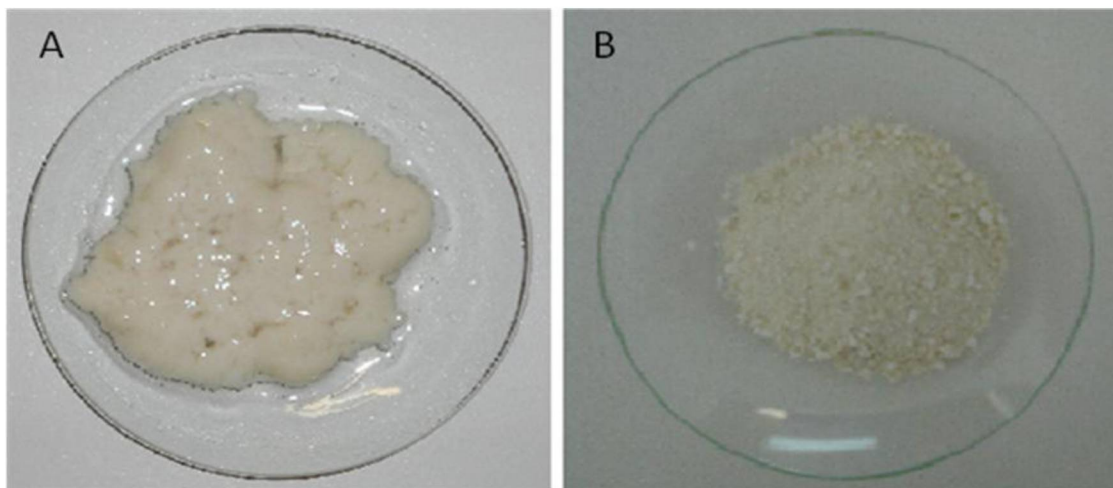


FIGURA 6 – CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS. Aspecto físico dos caseinofosfopeptídeos obtidos por hidrólise enzimática do caseinato de sódio, imediatamente antes do congelamento (A) e após a liofilização (B).

Resultados de rendimento entre 10 e 16%, próximos aos aqui descritos usando metodologia semelhante, particularmente para as condições 4h/50°C, já foram relatados (Ellegard et al., 1999; Krüger, 2006). Outros métodos de produção de CPP mostram rendimentos semelhantes aos relatados neste trabalho, como o de Adamson e Reynolds, (1996), por exemplo, mas usando alcalase por 2h/50°C. Já Reynolds, Riley e Adamson (1994) conseguiram resultados também semelhantes usando hidrólise trípica, mas em reação de 20 min/20°C em pH 3,5.

Interessante destacar alguns aspectos da tripsina empregada para a hidrólise dos CPP neste trabalho, cuja ação é maximizada à temperatura entre 40 e 55°C e pH de 7,5 a 9,5 (Novozymes, 2003). O objetivo de empregar a temperatura de 37°C, além da habitual, 50°C, bem como os tempos de 2 e 4h de reação para obtenção dos CPP foi no sentido de, mimetizando as condições da digestão gastrointestinal que ocorrem *in vivo*, observar, por um lado, os efeitos sobre a composição físico-química dessas moléculas e, por outro lado, avaliar seu perfil funcional em situações inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes por meio de ensaios biológicos *in vitro*.

A enzima PTN 6.0 (*Pancreatic Trypsin Novo*) apresenta como componente principal a tripsina (EC 3.4.21.4), contudo, segundo o fabricante, a quimotripsina (EC 3.4.21.1) pode estar presente como um constituinte menor. A tripsina é uma protease de serina com especificidade restrita. Em uma cadeia peptídica, essa

enzima hidrolisa preferencialmente as ligações no lado carboxil da arginina e de resíduos de Lisina (Novozymes, 2003; Tausin et al., 2003).

A análise centesimal do caseinato de sódio e dos CPP obtidos está descrita na Tabela 2, onde se observa que o conteúdo proteico de todos os lotes de CPP foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao teor observado para o caseinato de sódio, com redução de até 20% da proteína original.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO CASEINATO DE SÓDIO E DE SEUS PRODUTOS DE HIDRÓLISE COM TRIPSINA PTN 6.0 EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.

PRODUTO	PROTEÍNAS (%)
Caseinato de sódio	91,61 ^a ± 0,95
CPP 2h/37°C	84,86 ^b ± 3,05
CPP 2h/50°C	71,00 ^c ± 1,21
CPP 4h/37°C	73,59 ^c ± 2,43
CPP 4h/50°C	75,24 ^c ± 3,75

Cada valor representa a média ± DP para amostras analisadas em duplicata ($n=2$; $p < 0,05$, ANOVA, *post hoc*, Tukey). Letras distintas denotam diferença estatística entre produtos.

Entre as frações, apenas o CPP 2h/37°C mostrou teor proteico significativamente diferente ($p < 0,05$) dos demais, demonstrando que outros fragmentos proteicos foram obtidos. Os demais CPP apresentaram resultados comparáveis aos do grupo dinamarquês (Ellegard et al., 1999) e ligeiramente maiores que a do grupo de Teucher e colaboradores (2006), que encontraram teor proteico de 69% em seus produtos.

O conhecimento do teor de umidade de matérias-primas tem grande importância na conservação, armazenamento e na manutenção da sua qualidade e no processo de comercialização. Neste contexto, tendo em vista que a liofilização foi o método de secagem escolhido para manutenção dos CPP e que todos foram processados sob as mesmas condições, foi selecionada a fração CPP 4h/50°C para avaliação do teor de umidade, cujo resultado foi de $4,44 \pm 0,02\%$, significativamente inferior ($p < 0,05$) aos $7,48 \pm 0,01\%$ observados para o caseinato de sódio. Esses

dados indicaram que o processo foi não só eficiente, como também ficou dentro dos critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual determina que o teor de umidade em produtos biológicos alergênicos liofilizados seja menor que de 5% (Brasil, 2005). Observou-se que o teor de cinzas de $21,50 \pm 1,27\%$, determinado para o mesmo CPP foi, da mesma forma, significativamente maior ($p < 0,05$) do que o valor de $4,45 \pm 0,97\%$ obtido para o caseinato de sódio.

Com relação ao cálcio e fósforo, todas as frações, independente das condições de hidrólise empregadas, tiveram teores significativamente superior ao observado para a matéria-prima (Tabela 3) ou àqueles citados na literatura (Krüger et al., 2006).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FRAÇÕES DE CPP OBTIDOS POR DIGESTÃO CONTROLADA DO CASEINATO DE SÓDIO COM TRIPSINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES.

PRODUTO	CÁLCIO (mg/100g)	SÓDIO (mg/100g)	FÓSFORO (mg/100g)
Caseinato de sódio	$131,69 \pm 6,4^a$	$1737,98 \pm 31,93^a$	$760,08 \pm 19,97^a$
CPP 2h/37°C	$3450,03 \pm 83,33^b$	$407,20 \pm 19,51^b$	$2574,09 \pm 66,05^b$
CPP 2h/50°C	$5132,88 \pm 95,47^c$	$829,38 \pm 26,1^c$	$2863,02 \pm 32,45^c$
CPP 4h/37°C	$5146,18 \pm 482,24^c$	$1182,94 \pm 244,05^{c,d}$	$3099,27 \pm 6,85^d$
CPP 4h/50°C	$5019,67 \pm 188,72^c$	$1221,31 \pm 217,82^d$	$2957,42 \pm 35,96^c$

Cada valor representa a média \pm DP do teor dos minerais indicados ($n=3$; $p < 0,05$ ANOVA, *post hoc*, Tukey). Letras distintas denotam diferença estatística entre produtos. CPP: caseinofosfopeptídeos.

FONTE: Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (2012).

A literatura mostra ampla faixa de valores para o teor de cálcio quando comparados aos resultados desse trabalho. Enquanto Ellegard e colaboradores (1999), por exemplo, obtiveram valores cerca de 40% superiores, os valores citados por Teucher et al. (2006) são ligeiramente maiores que os desse trabalho. Em contraste, Krüger e colaboradores (2006) encontraram teor de cálcio nove vezes menor ($452 \text{ mg}/100 \text{ g}$) em relação a este estudo. Mesmo com distinção nítida entre valores, esses resultados mostram que o consumo de 20 a 30 g dos CPP poderia

atender a 100% da recomendação diária adequada (RDA) de cálcio, indicando que o processo aqui empregado pode levar à utilização favorável desses produtos na suplementação e/ou enriquecimento de alimentos.

Já com relação ao conteúdo de fósforo, o lote de CPP 4h/37°C foi o que apresentou conteúdo mais elevado, indicando a presença de maior quantidade de peptídeos fosforilados. O fato dessas moléculas formarem sais orgânicos fosforilados solúveis as torna úteis na função de carreadores para diferentes minerais, especialmente o cálcio (Meisel, 1997), agregando maior valor à sua utilização alimentar.

Em relação ao teor de sódio, este foi proporcional às condições de reação, uma vez que a quantidade de hidróxido de sódio utilizada para manter o pH estável da reação variou proporcionalmente com o tempo e a temperatura de incubação. Contudo, é importante destacar que todas as frações de CPP apresentaram teores de sódio significativamente menores ($p < 0,05$) que o caseinato de sódio inicial. Esses resultados também variaram para mais com relação aos valores relatados por Ellegard et al. (1999) e Krüger et al. (2006), em contraste ao teor de fósforo já citado, cujos resultados foram próximos aos obtidos por esses mesmos autores.

4.1.2 Caracterização dos CPP

Com o objetivo de analisar não só a pureza, mas também observar se o processo de hidrólise empregado levou à formação de peptídeos de baixo molecular como desejado, amostras dos hidrolisados foram submetidas à SDS-PAGE em condições desnaturantes seguida de coloração com solução de azul brilhante de Coomassie.

Como ilustrado na Figura 7 e, corroborando com a literatura que demonstra que os CPP apresentam peso molecular inferior a 6 kDa (Kitts, 2005; Sarmadi; Ismail, 2010), bandas largas difusas, na região reservada a moléculas de pequena massa molecular, foram observadas em todas as amostras, confirmando que o processo de hidrólise foi eficiente, resultando em uma coleção de peptídeos de tamanho desejado, em nítido contraste ao tamanho observado para o caseinato de

sódio inicial, para a caseína e para a soroalbumina bovina, usadas como marcadores de tamanho, todos com massa molecular próxima de 25 kDa.

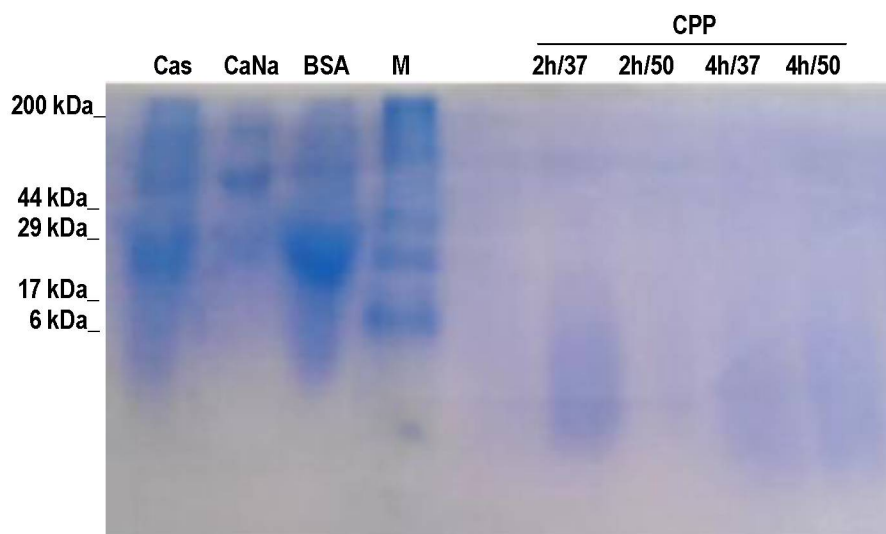


FIGURA 7 - SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMINA (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDAS APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO CASEINATO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA. Cas: caseína. CaNa: caseinato de sódio. BSA: soro albumina bovina. M: marcador de peso molecular. CPP: caseinofosfopeptídeos.

4.1.3 Espectrometria de massas

Com o objetivo de melhor caracterizar a nuvem de moléculas de baixo peso molecular observada no ensaio eletroforético, foi empregada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (IES-EM), a qual tem sido empregada nas mais diversas áreas da ciência nos últimos anos (Crotti et al., 2006), particularmente para estudos de compostos pouco voláteis como as biomoléculas em questão.

Esta ferramenta consiste na formação de um jato (*spray*) eletrostático a partir do bombardeamento de uma amostra, gerando pequenas gotas ionicamente carregadas. Destas, são liberados íons para uma fase gasosa, os quais são representativos dos complexos de uma amostra que são separados de acordo com a relação massa/carga (m/z), dando informações sobre sua constituição química, sua massa molecular e, em alguns casos, podendo levar à identificação da fórmula

molecular quando em combinação com outras técnicas espectroscópicas, principalmente a Ressonância Magnética Nuclear e a Espectroscopia de Absorção nas regiões do infravermelho e do UV/Vis (Gaucheron et al., 1995; Vessecchi et al., 2008).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de *soft-ionization*, onde uma pequena quantidade de energia é transferida para a amostra durante o processo de ionização, resultando em moléculas fragmentadas com íons de energia residual interna relativamente baixa. A análise do espectro de massas mostra íons pouco fragmentados e íons precursores relativamente intensos. Embora a determinação da massa molecular seja facilitada nessa técnica, pouca ou nenhuma informação estrutural pode ser obtida, em virtude do número reduzido de íons fragmentados formados. A identidade dos íons em fase gasosa, formados na fonte de ionização, está relacionada às suas grandezas termoquímicas (Vessecchi et al., 2008).

A fim de aperfeiçoar o processo e obter sinais apropriados para estudo dos CPP no EM, diferentes condições no desenvolvimento do método de análise foram testadas, como a mistura solvente, a temperatura de reação e a voltagem de operação. Após várias tentativas, estabeleceu-se que a solubilização em água:TFA (v/v), a temperatura de 200°C e a diferença de potencial (PD) de 40 V seriam as mais apropriadas para se observar maior intensidade de sinal nos espectros, os quais estão compondo as Figuras 8 à 11, respectivamente, para os CPP 2h/37°C, 2h/50°C, 4h/37°C e 4h/50°C.

Neles é possível observar, pelos picos de m/z , que quanto maior a temperatura e o tempo de hidrólise, maior a fragmentação proteica. Em outras palavras, quanto menor o tempo e a temperatura de hidrólise empregada, maior o tamanho molecular dos CPP.

Análise mais detalhada desses espectros mostra que, dentre os processos, o que apresentou menor quantidade de fragmentos de peptídeos e aminoácidos de menor tamanho foi o CPP 2h/37°C (Figura 8) e, peptídeos com tamanho de até 1000 Da estão presentes em todas as frações. Miquel e colaboradores (2005; 2006) sugerem que CPP de massa molecular entre 527 e 6512 Da são bons candidatos para a absorção intestinal e para desempenhar possíveis efeitos fisiológicos no organismo, uma vez que podem ser absorvidos e transportados através de vários

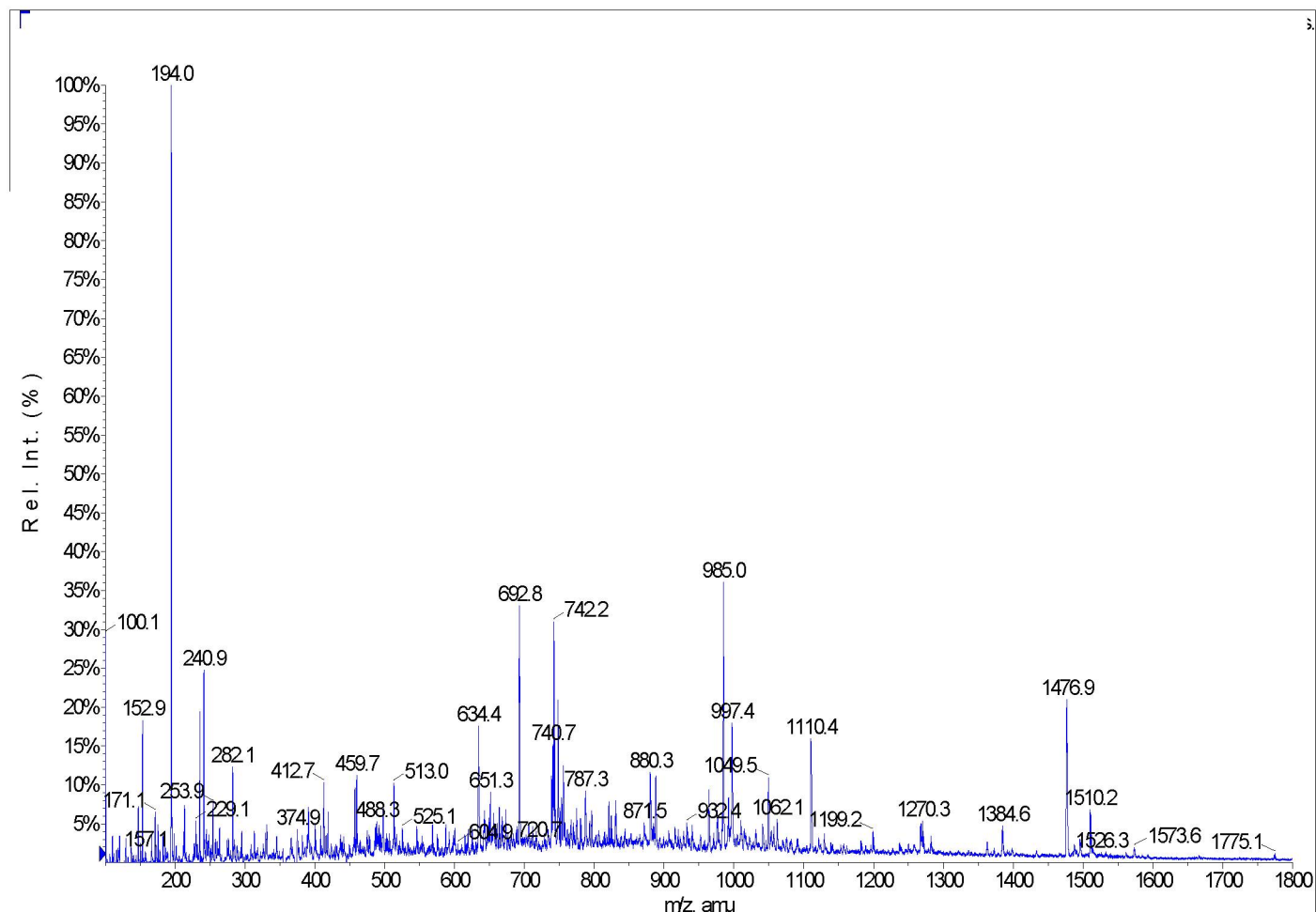


FIGURA 8 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 2h/37°C. Espectros obtidos em espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) com ionização do tipo *Eletrospray* (ESI), com fonte operada no modo positivo (voltagem do capilar igual a 4 kV, potencial de desagrupamento igual a 40 eV). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 900 a 1800 Daltons (Da).

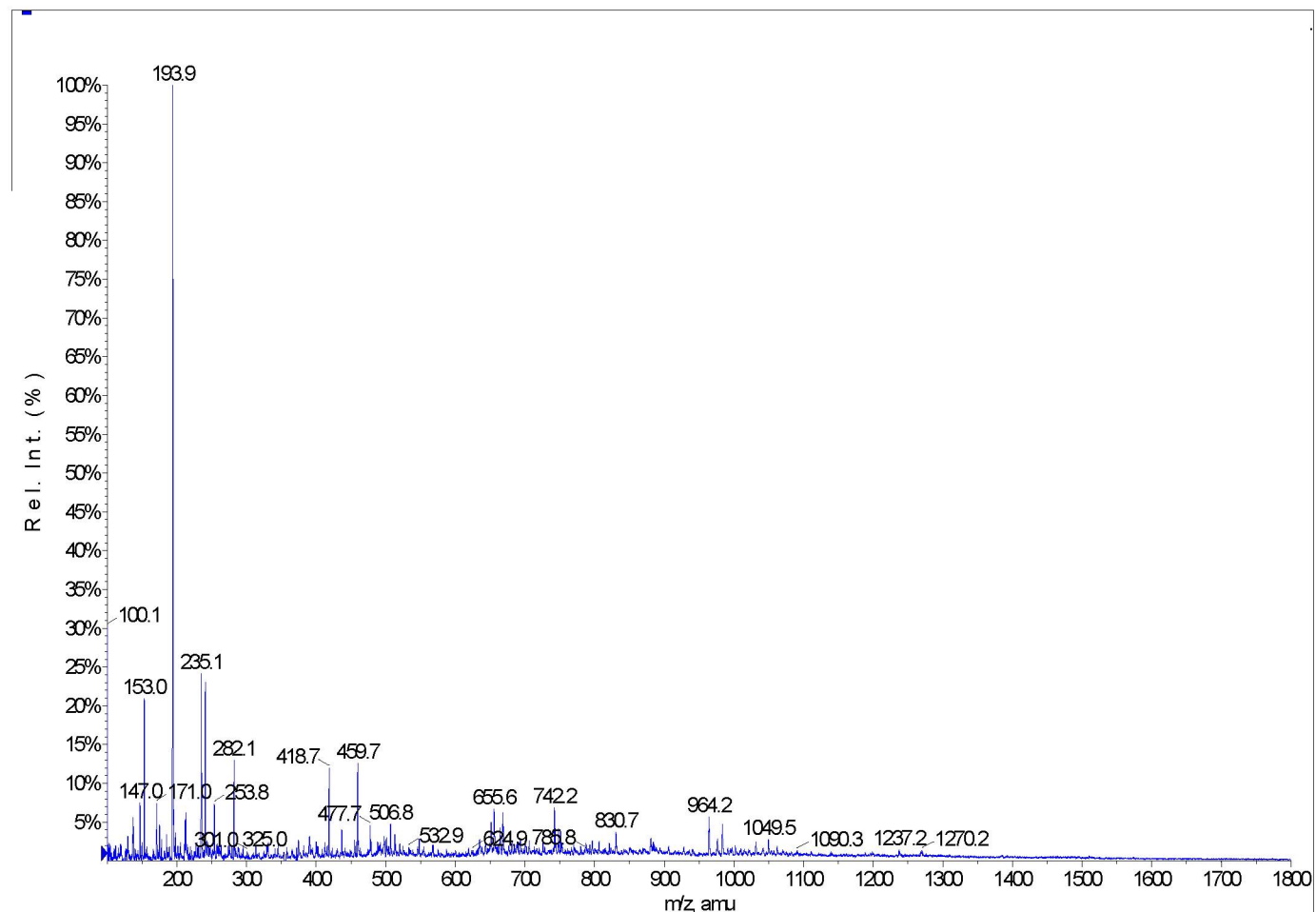


FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 2h/50°C. Espectros obtidos em espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) com ionização do tipo *Eletrospray* (ESI), com fonte operada no modo positivo (voltagem do capilar igual a 4 kV, potencial de desagrupamento igual a 40 eV). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 900 a 1800 Daltons (Da).

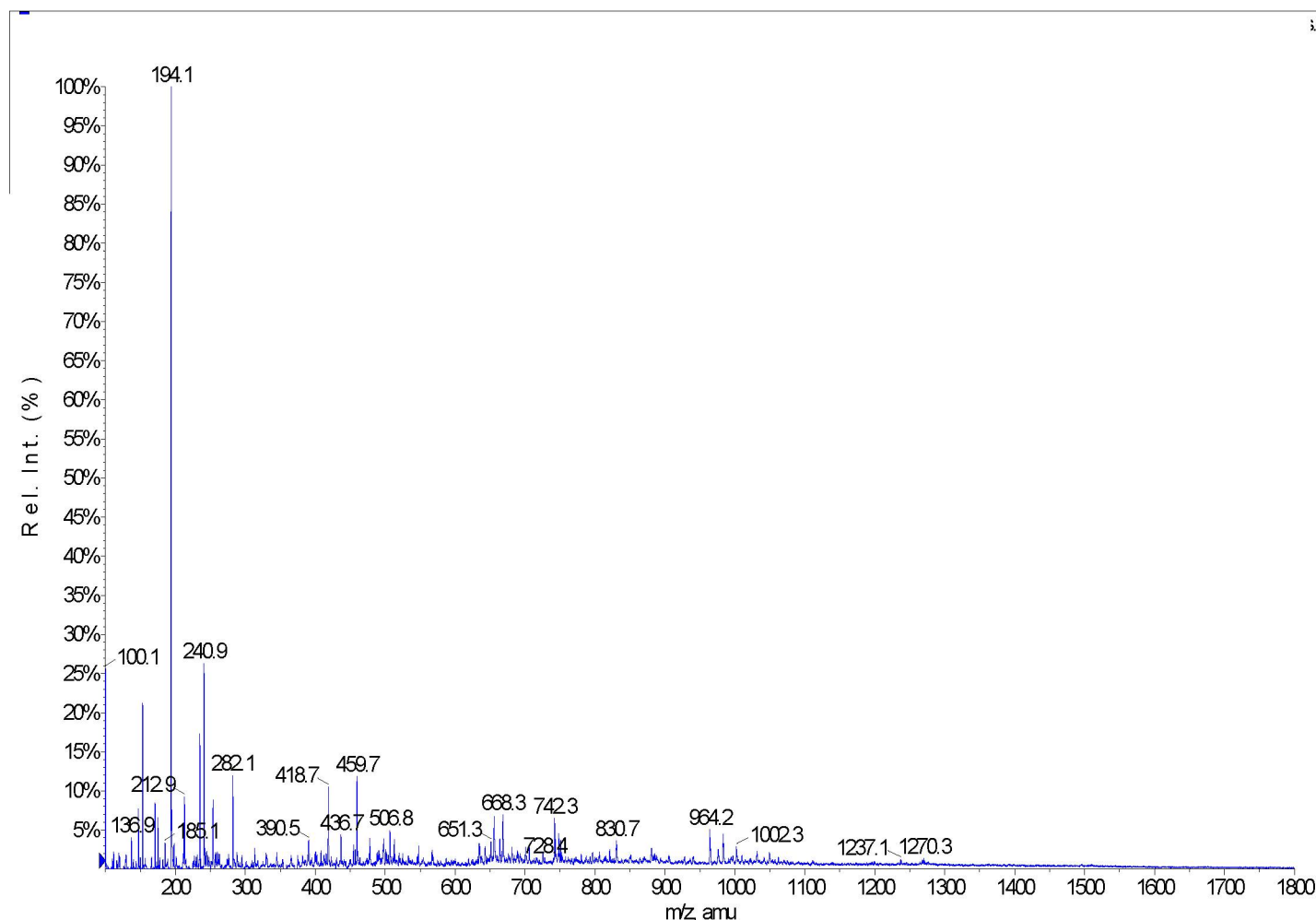


FIGURA 10 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 4h/37°C. Espectros obtidos em espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) com ionização do tipo *Eletrospray* (ESI), com fonte operada no modo positivo (voltagem do capilar igual a 4 kV, potencial de desagrupamento igual a 40 eV. Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 900 a 1800 Daltons (Da).

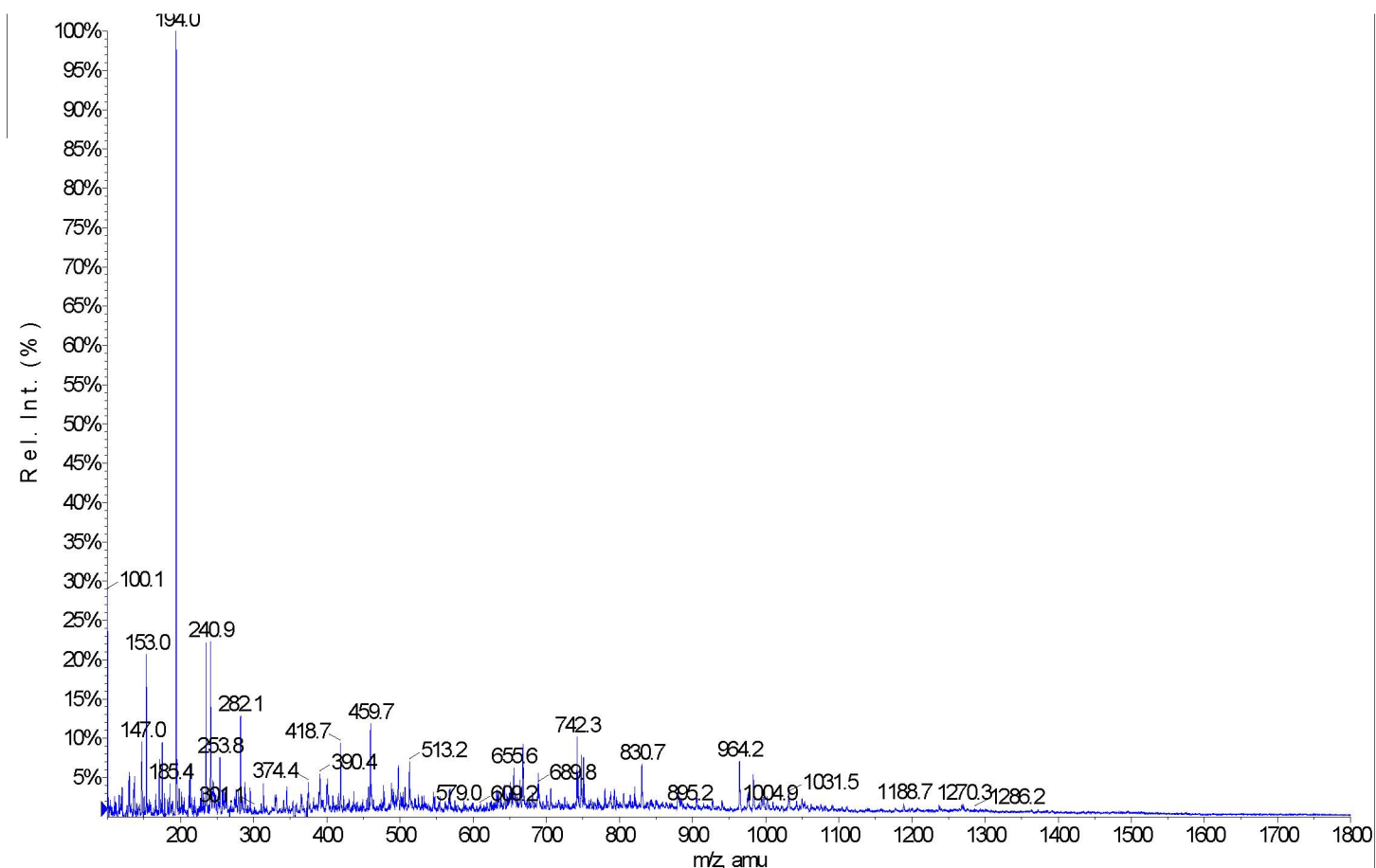


FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE 4h/50°C. Espectros obtidos em espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) com ionização do tipo *Eletrospray* (ESI), com fonte operada no modo positivo (voltagem do capilar igual a 4 kV, potencial de desagrupamento igual a 40 eV. Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 900 a 1800 Daltons (Da).

mecanismos, incluindo as vias paracelular (difusão passiva) e intracelular (difusão facilitada), o sistema linfático e transportadores basolaterais como o PepT1, cuja via depende de certas propriedades, como, por exemplo, o tamanho molecular, as características estruturais e a hidrofobicidade. O PepT1 é um exemplo particularmente relevante de transportador, pois utiliza um gradiente eletroquímico de prótons para carrear pequenos peptídeos resistentes à hidrólise do enterócito para a corrente sanguínea (Sarmadi; Ismail, 2010; Power; Jaleman; FitzGerald, 2013).

Os aminoácidos são carreados por grupos de transportadores específicos localizados ao longo da superfície das membranas da borda em escova e da basolateral do intestino delgado, com maior abundância no jejuno. Os mecanismos de transporte também incluem difusão simples, difusão facilitada e transporte ativo (Power; Jaleman; FitzGerald, 2013).

Como os dados espectrais resultantes mostraram que as frações de CPP obtidas são compostas por vários tamanhos de moléculas peptídicas, investigou-se em seguida, a similaridade desses fragmentos entre as amostras. Para tanto, usou-se a calibração multivariada, a qual inclui as etapas de modelagem, que objetiva estabelecer as relações matemáticas entre os resultados experimentais obtidos (matriz X) e as concentrações do analito em estudo (matriz Y), e de validação, onde o objetivo é otimizar a relação obtida entre a medida instrumental e a concentração (Ferreira et al., 1999).

O método PCA constitui-se na base de grande parte dos métodos de calibração multivariada e consiste na construção de um novo sistema de eixos, conhecidos como componentes principais (PC) ou variáveis latentes, que permite a visualização dos dados em poucas dimensões (Ferreira et al., 1999). A função dos PC é descrever se há variação entre as amostras, partindo da definição de novos eixos, que se alinhem mais com os dados. Assim, os dados espectrais das quatro amostras foram submetidos a uma rotina de PCA. Para tanto, foram escolhidos dois PC, correspondentes a 96,47% (Figura 12) de variação cumulativa, dos quais originou-se o gráfico de *scores*, representado na Figura 13.

Como ilustrado na Figura 13, as amostras se localizaram em três regiões distintas, tendo como referência o ponto central do gráfico de *scores*. De acordo com

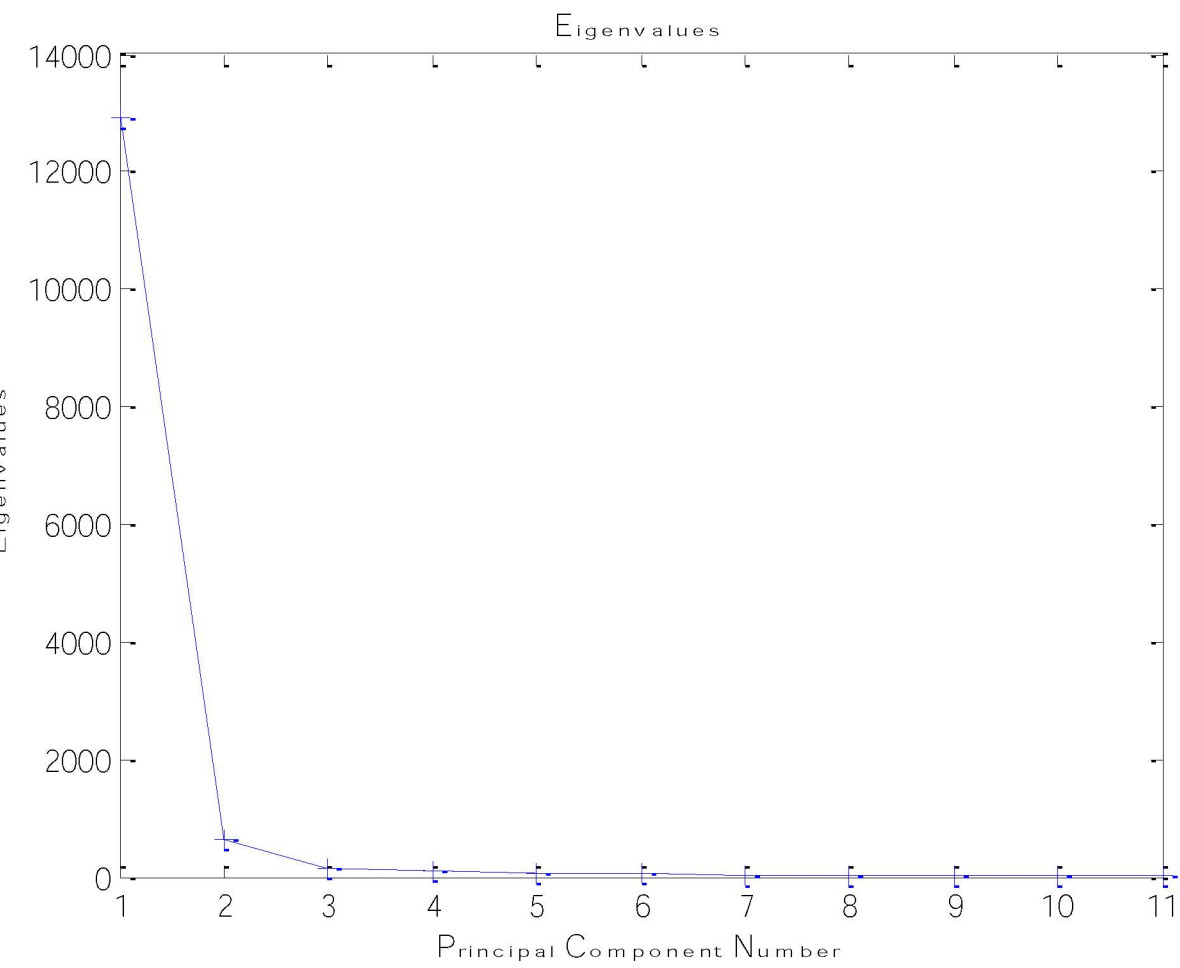


FIGURA 12 - NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE ACORDO COM O MÉTODO PCA - *PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS*.

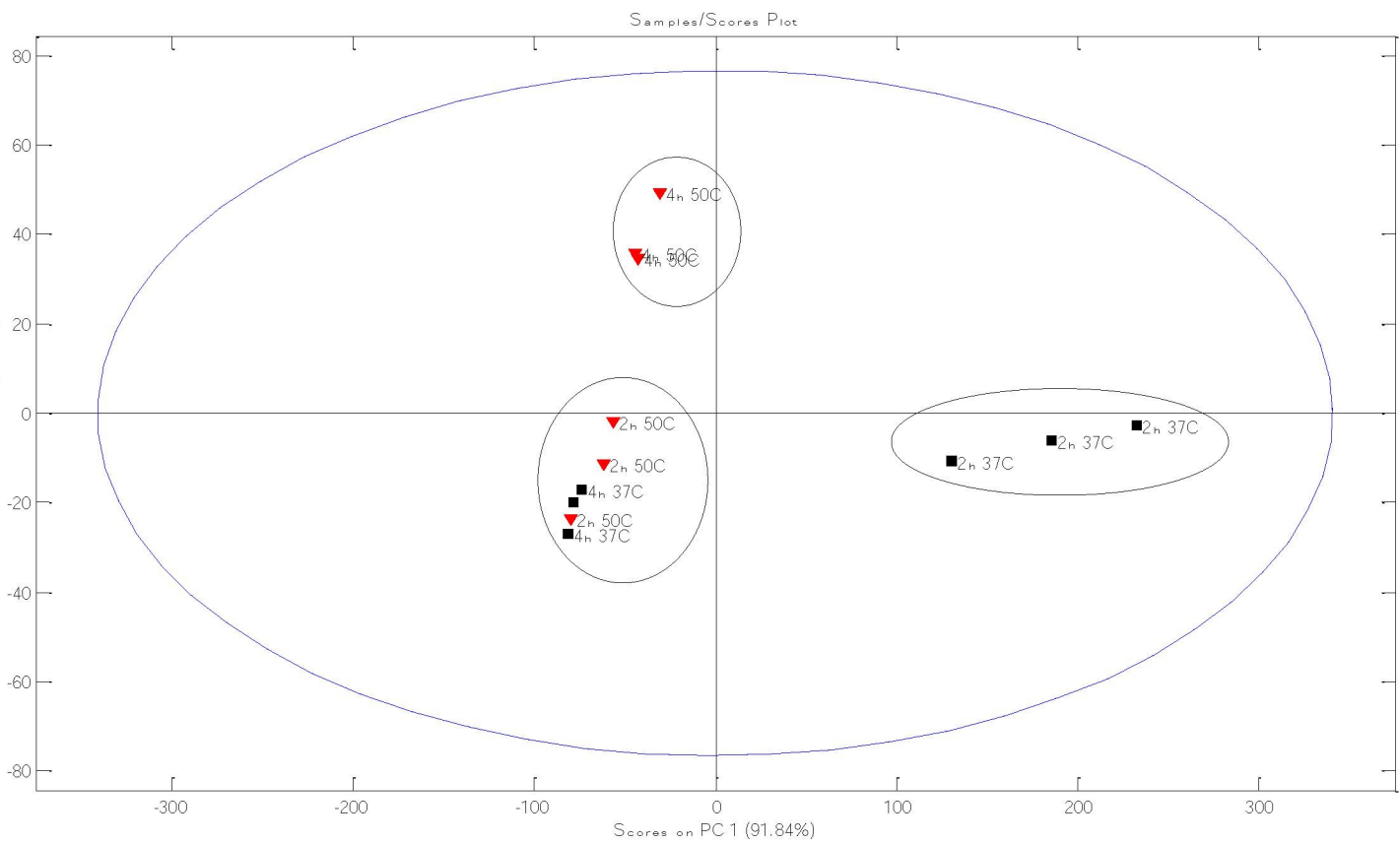


FIGURA 13 - GRÁFICO DO CONJUNTO DE DADOS BIDIMENSIONAIS, DEMONSTRANDO OS EIXOS DAS VARIÁVEIS LATENTES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC 1 E PC 2)

a PCA, os CPP 2h/50°C e 4h/37°C, ambos localizados no quadrante inferior esquerdo, apresentaram maior similaridade entre si em função das intensidades de m/z mais próximas quando comparadas aos outros dois grupos. Esse fato deve-se, provavelmente, à diminuição da temperatura ótima da enzima utilizada, necessitando de mais tempo para obter a mesma fragmentação.

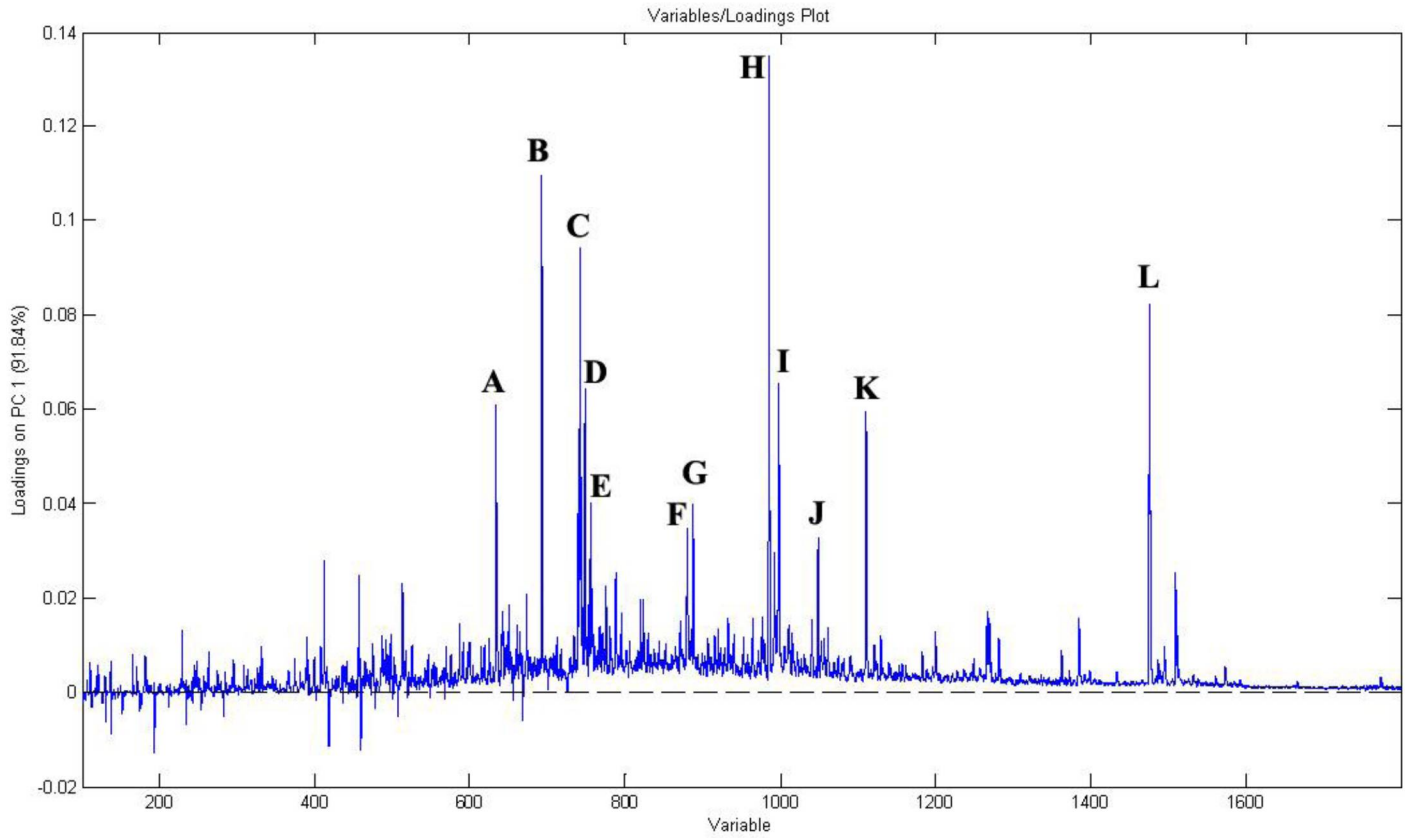
Os gráficos de *loading* para PC 1 e PC 2 (Figuras 14 e 15) permitem avaliar quais as intensidades de m/z que influenciam na separação entre os grupos. É possível extrair do gráfico de scores (Figura 13) que o PC 1 é responsável pela separação entre os grupos de CPP 4h/50°C, 2h/50°C e 4h/37°C e o grupo 2h/37°C. Pela Figura 14, observa-se que os principais íons que colocam o grupo de CPP 2h/37°C no lado positivo de PC 1 variam entre 634,5 a 1476,8 Da.

O lado positivo de PC 2 do gráfico de *loadings* (Figura 15) mostra que as intensidades responsáveis por manter a amostra de CPP 4h/50°C nesse lado são mais amplas, variando entre 175 a 964,2 Da. No lado negativo de PC 2, são mais importantes para diferenciar as amostras os íons 193,7, 692,7, 685,2 e 1477 Da.

Dada a complexidade dos espectros, não é possível distinguir visualmente as diferenças de m/z entre os grupos, principalmente os grupos CPP 2h/50°C, 4h/50°C e 4h/37°C.

4.1.4 Determinação do conteúdo de aminoácidos por CLAE

Neste estudo, pertinente foi conhecer não só a composição, mas também a quantidade de cada aminoácido que poderia estar presente nas diferentes frações de CPP sob estudo. Para tanto, utilizou-se a CLAE acoplada a detectores UV e de fluorescência convencional por ser o método mais amplamente utilizado na análise de proteínas alimentares (Léonil et al., 2000), uma vez que permite a separação e a análise quantitativa dos mais variados componentes presentes em amostras de natureza diversa, em escala de tempo reduzida com alta resolução, eficiência e sen-



RA 14 - GRÁFICO DE LOADING DE PC 1 COMPOSTO POR CPP 2h/37 °C, CPP 2h/50°C E CPP 4h/4,5; B=692,8; C=742; D=748; E=755,5; F=880,3; G=888; H=984,9; I=997,5; J=1049,5; K=1111; L=1476,8

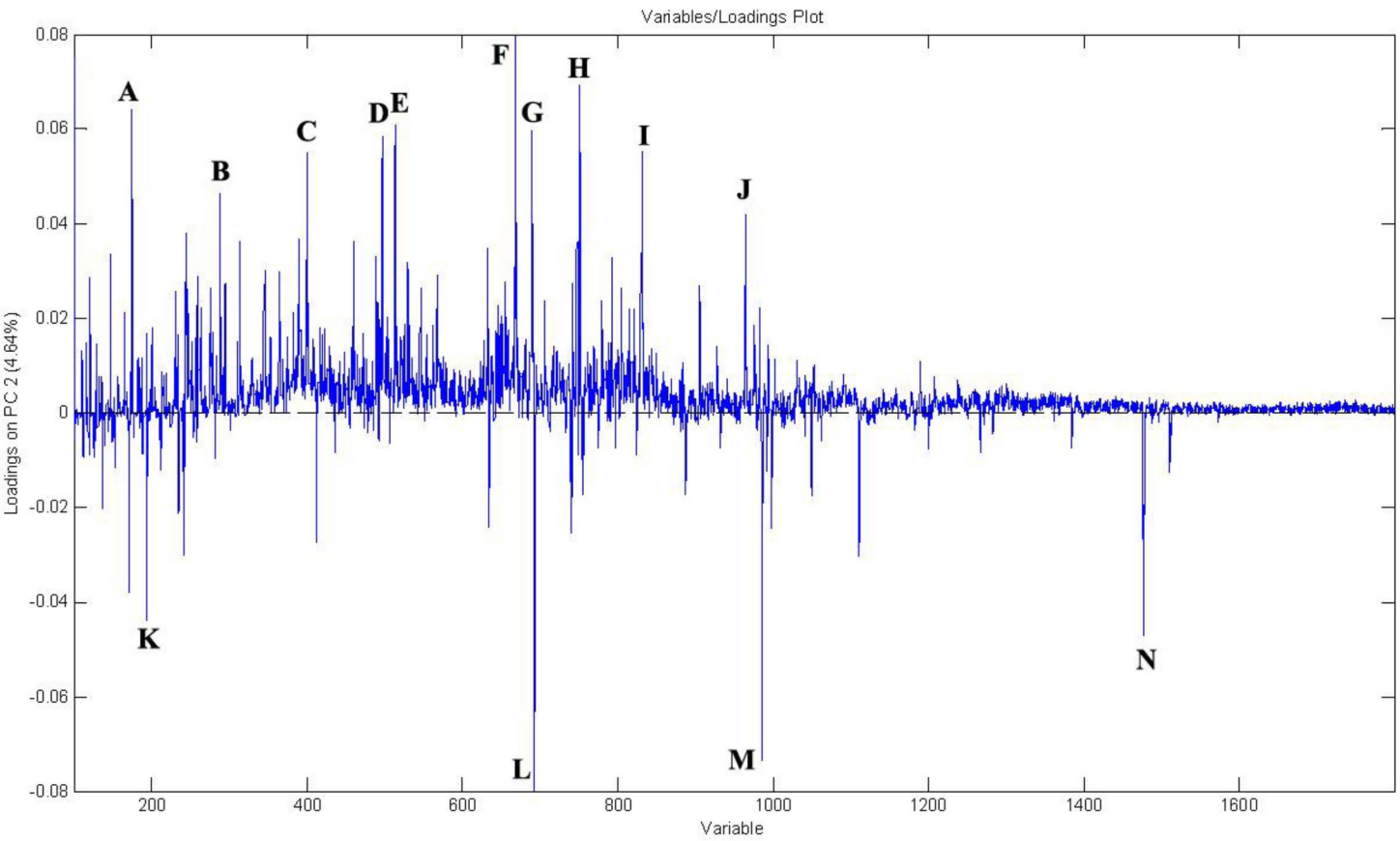


FIGURA 15 - GRÁFICO DE LOADING DE PC 2 COMPOSTO POR CPP 2h/50°C, CPP 4h/37°C E CPP 4h/50°C. A=175; B=288; C=405.0; D=497,8; E=513,2; F=667,9; G=689,2; H=751; I=830,7; J=964,2; K=193,7; L=692,7; M=685,2; N=1477.

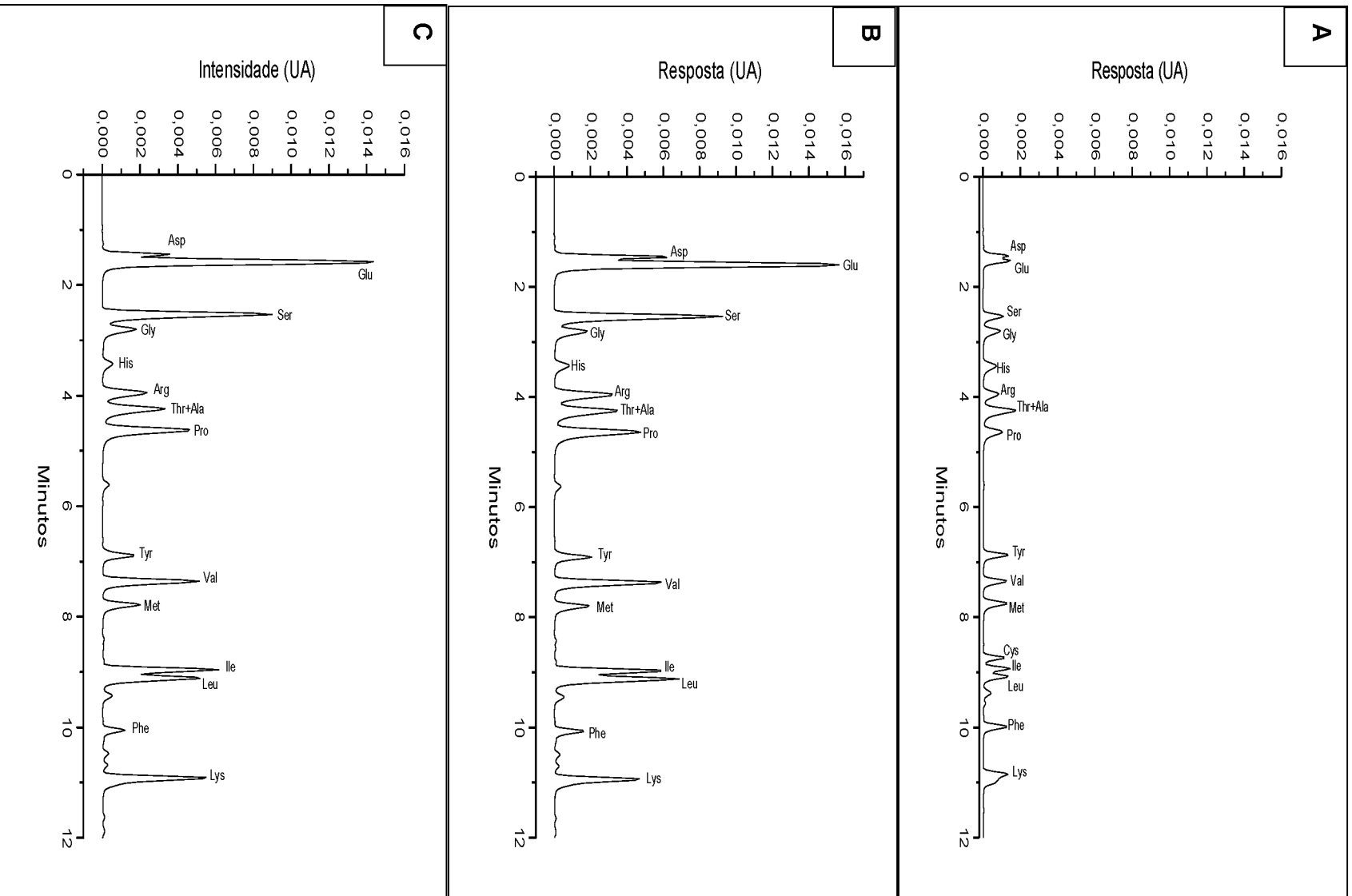
sibilidade.

Entretanto, antes da separação e quantificação dos aminoácidos nos CPP por CLAE, foi necessário extraí-los por hidrólise ácida. Os resultados desses procedimentos estão ilustrados nos cromatogramas que compõem a Figura 16 (A-E). A Tabela 4 mostra a quantidade relativa de aminoácidos essenciais e não essenciais, respectivamente, presente em cada um desses CPP.

Embora em concentrações bastante distintas, todos os hidrolisados apresentaram ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), serina (Ser), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), cisteína (Cys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe) e lisina (Lys) em sua composição, de acordo com os resultados obtidos da comparação entre os picos característicos e correspondentes das amostras e aqueles exibidos pela solução comercial de aminoácidos, usada como padrão de referência. A quantidade aminoacídica encontrada nos CPP foi semelhante aos dados relatados na literatura (Ellegard et al., 1999; Krüger, 2006), apesar de diferenças entre os métodos de quantificação.

Entre os aminoácidos essenciais mais abundantes encontrados nesses CPP, destacaram-se a leucina, a isoleucina e a valina, de cadeia ramificada, denominados como BCAA, que são indispensáveis à alimentação humana e conhecidos pela relevância na manutenção da proteína corporal e para a síntese de alanina e glutamina (Blomstrand et al., 2006). Neste sentido, eles atuam de forma sincronizada, enquanto a leucina estimula a síntese proteica por atuar sobre a quinase denominada *mammalian Target of Rapamycin – mTor*, a isoleucina estimula a captação de glicose no músculo, sendo a Valina o principal substrato para a transaminação (Valerio; D'antona; Nisoli, 2011). Assim, a presença de BCAA pode minimizar a perda de massa magra durante a redução de massa corporal, beneficiar a cicatrização, melhorar o balanço proteico muscular em indivíduos idosos, sarcopênicos e desnutridos e, ainda, oportunizar benefícios no tratamento de hepato e nefropatias (Rogerio; Tirapegui, 2008; Power; Jakeman; FitzGerald, 2013).

Outros aminoácidos, como a tirosina e a fenilalanina, pela presença de anel aromático na cadeia N-terminal, têm potencial antioxidante, pois podem doar prótons a elétrons desemparelhados. Aminoácidos hidrofóbicos N-terminais, como valina e leucina, por exemplo, podem aumentar a solubilidade de peptídeos em uma matriz



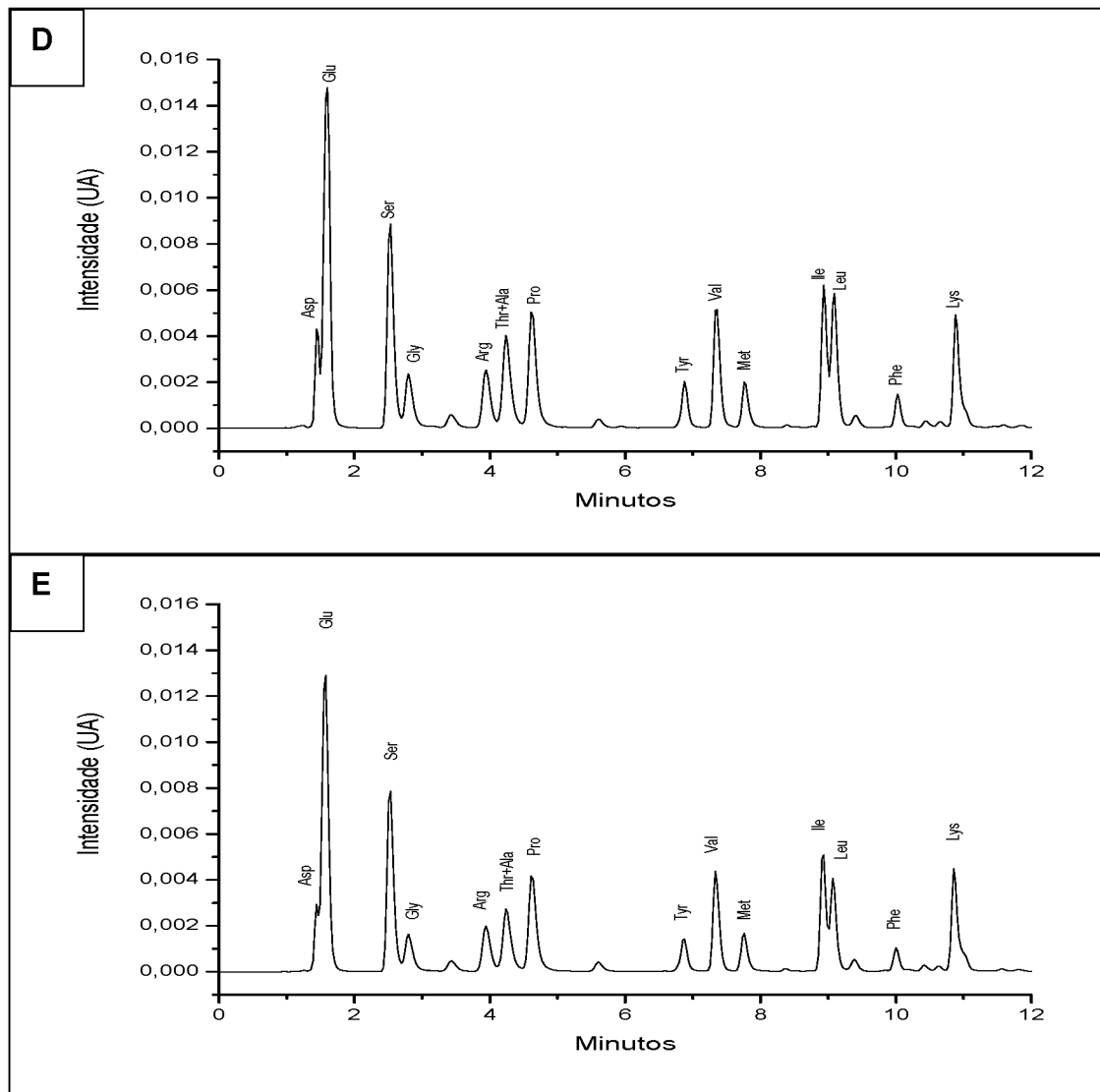


FIGURA 16 - COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE). Padrão de aminoácidos (A), CPP 2h/37°C (B), CPP 2h/50°C (C), CPP 4h/ 37°C (D) e CPP 4h/50°C (E). Legenda: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), serina (Ser), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), cisteína (Cys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), lisina (Lys).

lipídica, facilitando o acesso a espécies reativas hidrofóbicas ou a ácidos graxos poliinsaturados (Power; Jakeman; FitzGerald, 2013). Dessa forma, o conjunto desses aminoácidos nos CPP pode contribuir para aumentar a atividade antioxidante de peptídeos.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO RELATIVA DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NOS LOTES DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE TRÍPTICA DE CASEINATO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES OBTIDA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

CPP	2h/37°C	2h/50°C	4h/37°C	4h/50°C
AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS (%)				
Treonina+Alanina*	3,52±0,02 ^a	3,76±0,04 ^b	4,37±0,03 ^c	3,80±0,0002 ^b
Histidina	1,92±0,006 ^a	1,40±0,01 ^b	1,39±0,001 ^b	1,44±0,0008 ^c
Lisina	2,78±0,01 ^a	3,72±0,02 ^b	3,16±0,004 ^c	3,84±0,007 ^d
Leucina	6,54±0,02 ^a	5,32±0,08 ^b	5,64±0,10 ^b	4,43±0,15 ^c
Isoleucina	4,91±0,14 ^a	5,97±0,17 ^{a,c}	5,23±0,48 ^a	6,46±0,003 ^{b,c}
Metionina	1,89±0,01 ^a	2,15±0,01 ^b	2,05±0,001 ^c	2,21±0,001 ^d
Valina	5,05±0,002 ^a	4,81±0,02 ^b	4,80±0,01 ^b	4,95±0,005 ^c
Fenilalanina	1,96±0,002 ^a	1,48±0,02 ^b	1,57±0,001 ^c	1,54±0,005 ^c
AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS (%)				
Ácido Aspártico	8,37±0,61 ^a	4,27±0,38 ^b	5,88±0,27 ^c	1,32±0,01 ^d
Serina	7,91±0,05 ^a	8,77±0,08 ^b	8,16±0,02 ^c	9,43±0,01 ^d
Tirosina	2,48±0,009 ^a	2,44±0,02 ^a	2,60±0,006 ^b	2,55±0,002 ^b
Cisteína	0,03±0,0004 ^a	0,02±0,008 ^a	0,02±0,002 ^a	0,01±0,0004 ^a
Ácido Glutâmico	38,74±0,72 ^a	42,45±0,03 ^b	40,57±0,29 ^c	43,42±0,16 ^b
Glicina	2,71±0,001 ^a	3,04±0,02 ^b	3,93±0,002 ^c	3,38±0,01 ^d
Prolina	5,33±0,02 ^a	5,62±0,06 ^b	5,73±0,001 ^b	6,19±0,01 ^c
Arginina	5,87±0,11 ^a	4,78±0,07 ^b	4,91±0,02 ^b	5,02±0,01 ^b

*Alanina é um aminoácido não essencial. $p < 0,05$. ANOVA, *post-hoc* Tukey. Letras denotam diferença estatística entre caseinofosfopeptídeos (CPP) de colunas diferentes.

Entre os aminoácidos essenciais presentes, apesar de haver diferenças significativas em termos de teor de acordo com o tempo e temperatura de hidrólise, não há relevância nutricional.

Interessante e notável foi a elevada concentração de ácido glutâmico e serina, provavelmente fosforilada, dentre os aminoácidos não essenciais detectados, indicando e uma vez mais corroborando com os resultados anteriores que indicam êxito metodológico de obtenção de CPP. Em contraste, teores significativamente reduzidos foram observados para a cisteína, o que era de se esperar, uma vez que este encontra-se preferencialmente no soro do leite.

Ainda em relação aos aminoácidos não essenciais, maior quantidade de ácido aspártico foi registrada para o CPP 2h/37°C, em contraste com a fração 4h/50°C, na qual esse aminoácido foi detectado em níveis pelo menos seis vezes inferiores (Tabela 4). Para os demais aminoácidos não essenciais, mesmo com diferença estatística significativa, nutricionalmente, essas diferenças encontradas são relativamente semelhantes.

Asparagina e glutamina são aminas derivadas dos ácidos aspártico e glutâmico, respectivamente. Durante uma hidrólise ácida, como a ocorrida no processo usado neste trabalho, há clivagem de ligações aminas e a asparagina é convertida em ácido aspártico enquanto a glutamina passa à ácido glutâmico. Assim, a quantidade de ácido aspártico presente corresponde ao total de asparagina e, similarmente, ocorre com a glutamina.

4.2. ENSAIOS COM LEUCÓCITOS HUMANOS

4.2.1. Toxicidade

A realização de ensaios biológicos com células humanas exige testes preliminares para avaliação de sua toxicidade. Neste contexto, o ensaio que utiliza o corante Azul de Trypan é muito útil, pois permite observar seu efeito sobre as células em estudo, as quais, possuindo membrana citoplasmática íntegra, com preservação da sua permeabilidade seletiva, excluem o corante (Merchant; Kahn; Murphy, 1964). Desta forma, células viáveis, após alguns minutos em contato com o corante, apresentam-se incolores, esféricas e refringentes, enquanto que as células mortas ou inviáveis coram-se em azul. Neste trabalho, o teste com o corante Azul de Trypan foi utilizado não só para monitorar a viabilidade das células, como também para avaliar a toxicidade dos CPP sobre leucócitos humanos.

Em um primeiro momento, os leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram divididos em duas populações, GNC e MNC, ambos obtidos após centrifugação com gradiente de densidade. Todas as amostras apresentaram >90% de células viáveis após o processo de isolamento, independente da fração em análise.

Com o objetivo de avaliar sua toxicidade, GNC foram expostos a concentrações indicadas de caseína, caseinato de sódio e os quatro diferentes CPP e, seus efeitos investigados sob microscopia de luz, após duas horas de incubação a 37°C. Esse período de incubação corresponde ao tempo necessário para a realização dos ensaios de adesão celular e quimiotaxia. Os resultados, apresentados na Figura 17, foram normalizados em relação aos controles, constituídos de populações não expostas a nenhuma das substâncias em estudo, adotando-os como 100% de viabilidade celular.

Para GNC, todas as concentrações utilizadas de caseína (Figura 17-A), caseinato de sódio (Figura 17-B) ou das quatro frações de CPP (Figura 17-C, 17-D, 17-E e 17-F), apresentaram comportamento semelhante, não sendo evidenciado nenhum efeito tóxico, com > 95% de viabilidade celular, mostrando, portanto, serem seguros às células nos ensaios biológicos pretendidos, corroborando com a literatura (Jaziri et al., 1992). Há, também, estudos que avaliaram a toxicidade de CPP em diversos tipos celulares e em diferentes concentrações, demonstrando que tanto o caseinato de sódio quanto os seus hidrolisados não induzem alteração da membrana celular quando testados com Azul de Trypan (Phelan et al., 2010).

Esses resultados também são compatíveis com estudos sobre os efeitos de CPP na dieta humana, onde observou-se a inexistência de toxicidade para a saúde dos indivíduos (Teucher et al., 2006). Contudo, trabalhos sobre a segurança da ingestão de peptídeos sobre a saúde humana são escassos (Schaafsma, 2009), pois a maioria das pesquisas com CPP concentra-se na sua eficácia dietética e não na sua segurança.

4.2.2 Expressão de moléculas de adesão

A citometria de fluxo é um método bastante utilizado para investigar a presença de moléculas sobre a superfície celular. Neste trabalho, esse método foi utilizado para observar os efeitos dos diferentes lotes de CPP sobre a expressão das integrinas LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em leucócitos humanos, uma vez que essas, entre outras moléculas de adesão, são empregadas pelos leucócitos para deixar a corrente sanguínea e se moverem através do espaço intersticial em resposta a

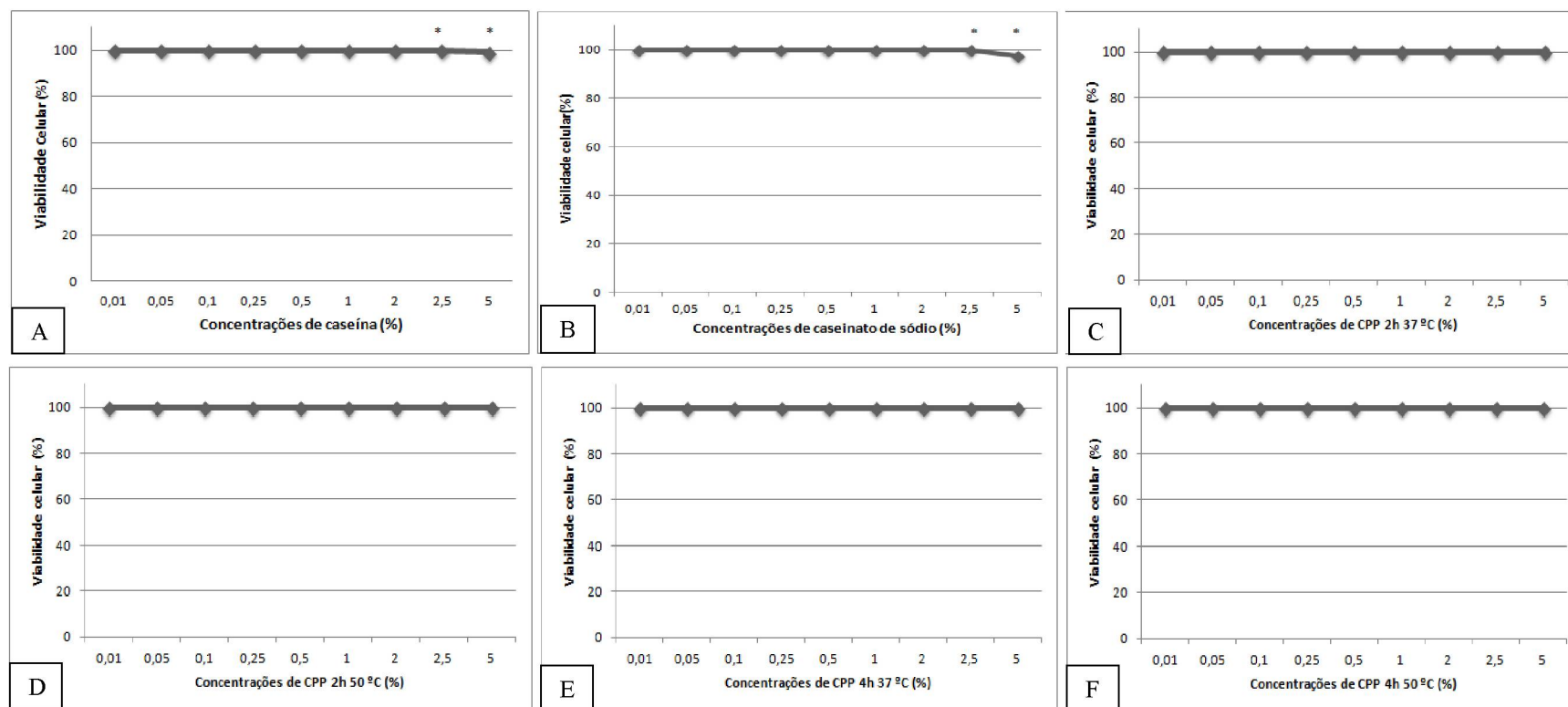


FIGURA 17 - EFEITO DA CASEÍNA BOVINA, CASEINATO DE SÓDIO E DOS CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE A VIABILIDADE DE GRANULÓCITOS HUMANOS. Granulócitos (10^6) obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram expostos às concentrações indicadas de caseína (A), caseinato de sódio bovino (B) e lotes dos diferentes CPP (C a F) como indicado. Os resultados representam a média \pm DP, em porcentagem, de células viáveis verificada pelo teste com Azul de Trypan após normalização dos dados em relação ao controle ($n=3$; $p<0,05$, ANOVA, *post hoc*, Tukey).

estímulos inflamatórios (López-Hoyos et al., 1999). O estudo do padrão de expressão de MA frente à CPP é central para o entendimento de sua ação no organismo humano, principalmente quando envolve processos inflamatórios patológicos.

Para tanto, leucócitos humanos foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para esses antígenos após serem expostos por 1 hora, a 37°C, à CPP na concentração de 1%. A Figura 18 ilustra a estratégia utilizada para essa análise, onde janelas específicas foram traçadas, baseadas no tamanho celular (FSC – *forward side scatter*) e na complexidade interna (SSC – *side light scatter*) distintas para cada população de células (Civin; Loken, 1987), onde R1 especifica a janela para linfócitos, R2 para monócitos e R3 para granulócitos.

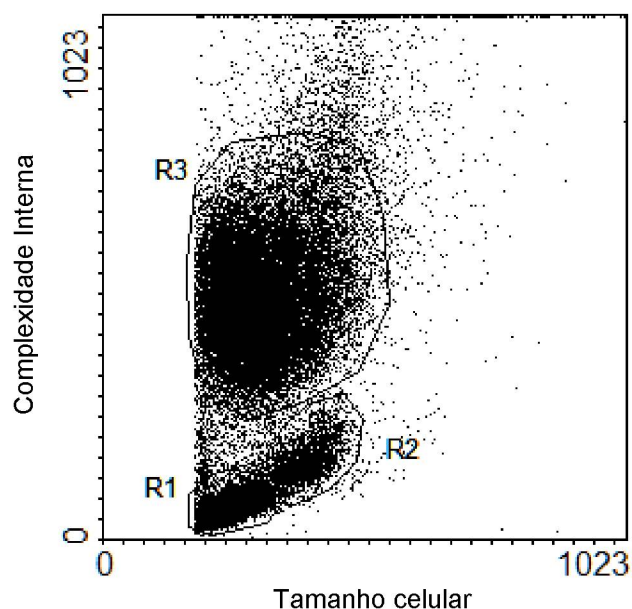


FIGURA 18 - ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO. O gráfico representa as populações de leucócitos analisados por citometria de fluxo obtidas de sangue periférico, onde as características de complexidade interna (SSC-H) e tamanho celular (FSC-H) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para análise da expressão de moléculas de adesão. R1 denota a região delimitada para linfócitos, R2 para monócitos e R3 para granulócitos, onde cada ponto representa uma célula detectada no sistema. Gráfico de um experimento representativo.

Em todas as determinações citométricas, um mínimo de 10^4 células foram analisadas e a linha limite de detecção baseou-se na máxima coloração obtida com a mesma população, porém sem estar marcada com o anticorpo monoclonal. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1% da linha limite. Os dados foram analisados usando o programa WinMDI 2.8 e os resultados estão apresentados como a porcentagem média de expressão para as células \pm DP. Exemplos de histogramas analisados para a expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em linfócitos, monócitos e granulócitos estão demonstrados nas Figuras 19 e 20.

Como demonstrado na Tabela 5, tanto linfócitos como monócitos e granulócitos exibem elevada expressão de LFA-1. Para VLA-4, linfócitos e monócitos têm também expressão elevada, em contraste com discreta expressão em granulócitos. Em relação à VLA-5, apenas monócitos a expressam de forma marcante, sendo muito discreta em linfócitos e praticamente ausente em granulócitos.

Quando se avaliou os efeitos da exposição das células aos CPP em relação à LFA-1, nenhuma alteração nos níveis de expressão foi observada, demonstrando que os CPP em estudo não interferem na sua expressão.

Em relação à expressão de VLA-4, foi observado que o CPP 2h/37°C levou à diminuição significativa ($p < 0,05$) de sua expressão em linfócitos em relação à população controle, enquanto o CPP 2h/50°C diminuiu, também de forma significativa, a expressão dessa integrina em granulócitos, ambos quando comparados às populações não tratadas (controle). Já o caseinato de sódio e os CPP 4h/37°C e 4h/50°C apresentaram efeito contrário, aumentando significativamente ($p < 0,05$) sua expressão em GNC (Tabela 5).

Com relação à VLA-5, verificou-se que somente nas populações de linfócitos e granulócitos houve aumento significativo ($p < 0,05$) de sua expressão quando as células foram tratadas com caseinato de sódio e com ambos os CPP 4h/37°C e 50°C.

Conforme apresentado na introdução desta dissertação, integrinas e seus ligantes desempenham papel fundamental em todos os eventos que envolvem adesão e migração celular em organismos multicelulares. Granulócitos, monócitos e

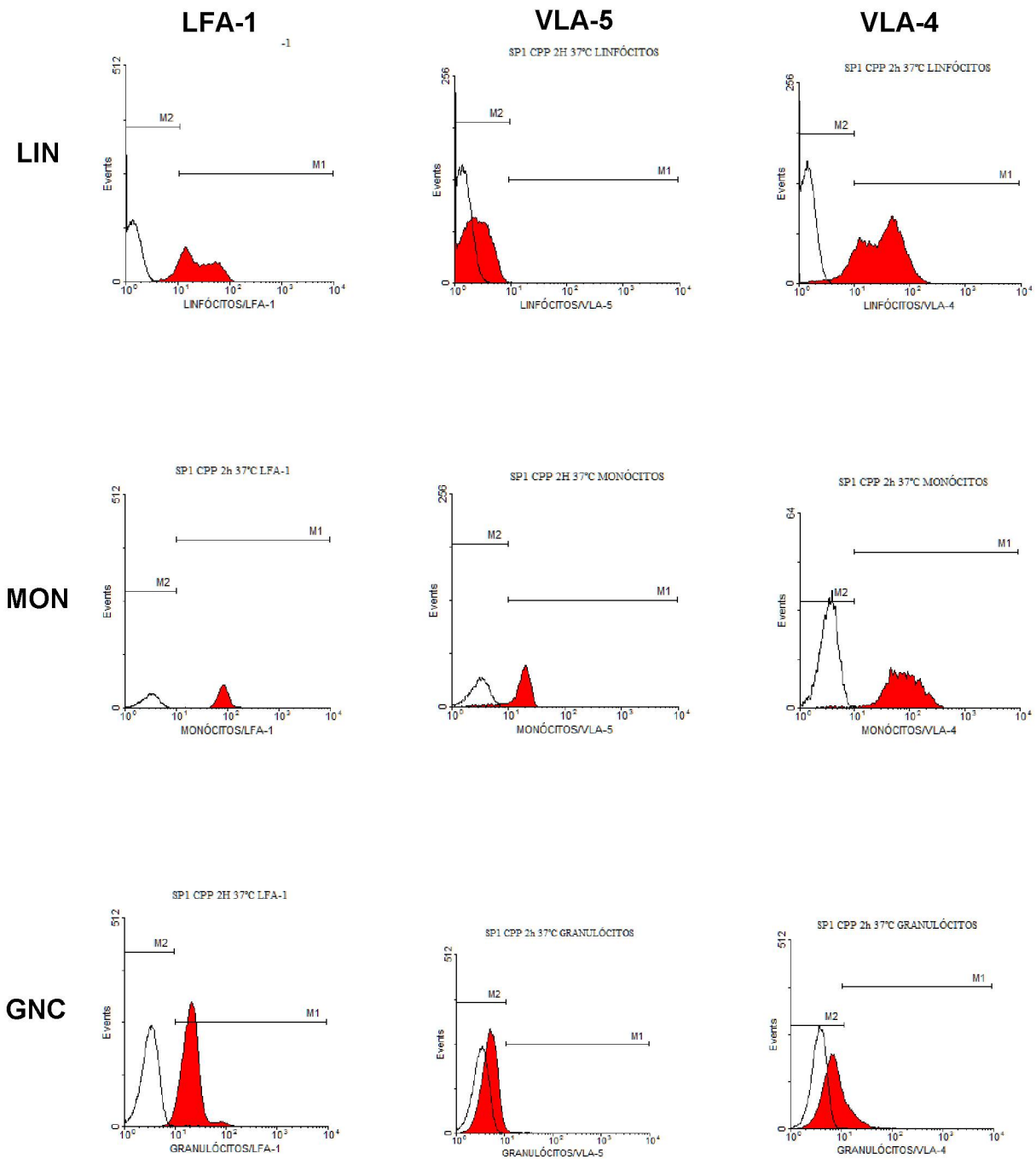


FIGURA 19 - EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-5 E VLA-4 NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SADIOS TRATADOS COM O LOTE DE CPP 2h/37°C.

Leucócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, após serem marcados com anticorpos monoclonais anti-LFA-1, anti-VLA-5 e anti-VLA-4, foram submetidos à análise por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que expressaram LFA-1, VLA-5 e VLA-4 (picos vermelhos) nas regiões dos linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GNC), delimitados pelo eixo M1. Histogramas de um experimento representativo.

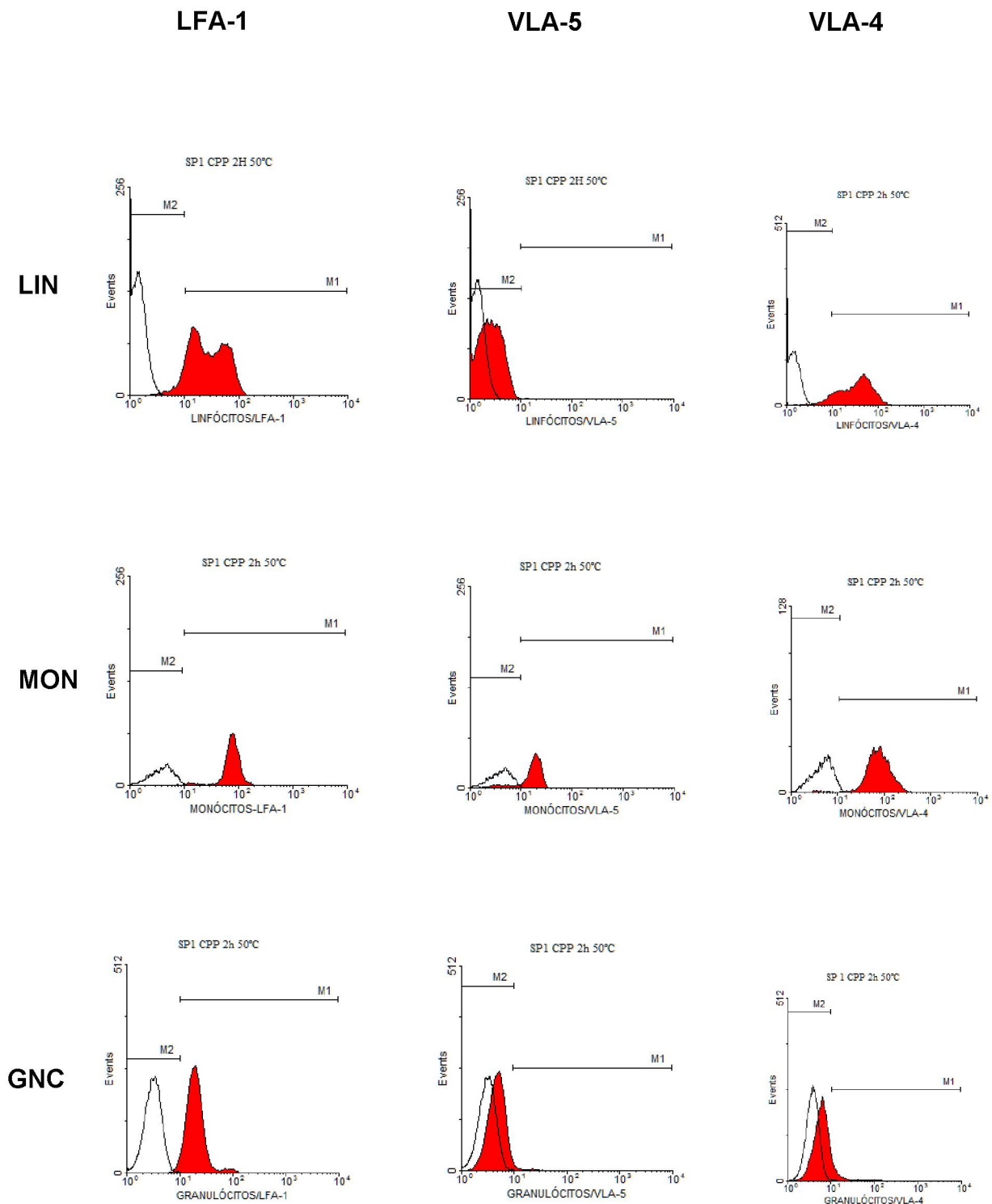


FIGURA 20 - EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-5 E VLA-4 NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS SADIOS TRATADOS COM O LOTE DE CPP 2h/50°C. Leucócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, após serem marcados com anticorpos monoclonais anti-LFA-1, anti-VLA-5 e anti-VLA-4, foram submetidos à análise por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que expressaram LFA-1, VLA-5 e VLA-4 (picos vermelhos) nas regiões dos linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GNC), delimitados pelo eixo M1. Histogramas de um experimento representativo.

TABELA 5 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS A CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS NA EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-4 E VLA-5 DETECTADA POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Condição	Expressão de LFA-1 (%)			Expressão de VLA-4 (%)			Expressão de VLA-5 (%)		
	LIN	MON	GNC	LIN	MON	GNC	LIN	MON	GNC
Controle	89,16±5,79 ^a	99,41±0,32 ^a	99,29±1,00 ^a	92,85±2,28 ^a	92,19±4,92 ^a	40,32±4,13 ^a	0,30±0,14 ^a	84,48±4,69 ^a	3,14±1,28 ^a
CaNa	92,96±6,53 ^a	99,57±0,24 ^a	98,6±1,97 ^a	90,06±7,85 ^{a,b}	99,04±0,91 ^a	96,91±3,02 ^b	3,34±0,45 ^b	70,63±2,38 ^a	17,7±1,35 ^b
CPP 2h/37°C	91,45±6,93 ^a	99,23±0,93 ^a	99,31±0,83 ^a	79,1±5,6 ^b	96,84±1,51 ^a	28,57±4,52 ^{a,c}	0,25±0,11 ^a	85,44±2,60 ^a	2,74±0,36 ^a
CPP 2h/50°C	92,51±5,98 ^a	99,41±0,68 ^a	99,86±0,04 ^a	82,82±5,11 ^{a,b}	94,83±3,4 ^a	21,55±8,23 ^c	0,28±0,0 ^a	85,27±4,35 ^a	4,41±0,97 ^a
CPP 4h/37°C	86,42±5,95 ^a	99,18±0,94 ^a	99,89±0,02 ^a	93,36±3,69 ^a	95,3±1,71 ^a	83,90±2,05 ^d	3,92±0,49 ^b	83,34±7,52 ^a	23,5±1,89 ^b
CPP 4h/50°C	91,41±1,45 ^a	97,14±3,71 ^a	99,82±0,13 ^a	94,08±2,4 ^a	99,22±0,99 ^a	91,38±3,05 ^{d,b}	3,69±0,7 ^b	75,36±9,18 ^a	18,55±5,44 ^b

Linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GNC) obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram expostos a soluções a 1% de caseinofosfopeptídeos (CPP), caseinato de sódio (CaNa) por 1 h a 37 C e, em seguida, marcados com anticorpos monoclonais para LFA-1, VLA-5 e VLA-4 como descrito na sessão de Material e Métodos. Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo quanto à sua expressão usando a estratégia descrita na Figura 10, onde um mínimo de 10⁴ células foi avaliado. Os valores representam a porcentagem média de expressão±DP (n=3; letras distintas representam diferença significativa entre os valores da mesma coluna, com p<0,05, ANOVA-Tukey).

linfócitos periféricos usam diversas dessas moléculas para aderirem ao endotélio e sua adesividade pode ser modulada pelo estado de ativação de ambos (Butcher, 1991).

A molécula de adesão LFA-1 é uma integrina β_2 normalmente presente nas subpopulações leucocitárias circulantes, com principal participação nos processos de adesão e migração dos leucócitos através do endotélio vascular e nos mecanismos primários envolvidos nas respostas inflamatória e imunitária (Larson; Hibbs; Springer, 1990; Evans et al., 2011). Da mesma forma, para o adequado engajamento e direcionamento da migração, é necessária a participação da integrina VLA-4 em cooperação com VLA-5 (Crisa et al., 1996).

De fato, níveis elevados de LFA-1 foram encontrados em todas as subpopulações de leucócitos humanos analisados nesse trabalho, corroborando com a já conhecida ubíqua distribuição dessa molécula em leucócitos circulantes (Nardin et al., 2008), independente de seu estado de ativação.

Como anteriormente citado, a integrina VLA-4 medeia o rolamento de leucócitos ligando-se principalmente a VCAM-1, mas também à fibronectina, uma das principais proteínas da MEC, em resposta a estímulos quimiotáticos, sendo um componente crítico para a migração tecidual específica durante a inflamação (Yusuf-Makagiansar et al., 2002; Hyun et al., 2009).

Quando análise de VLA-4 foi realizada com as frações leucocitárias já citadas, elevada expressão foi encontrada em linfócitos e monócitos, confirmando outros relatos referentes à sua expressão constitutiva (Larson; Hibbs; Springer, 1990; Corradi-Perini et al., 2010). Em contraste aos MNC, níveis reduzidos desse receptor foram encontrados em GNC, também confirmando dados produzidos por Nardin et al. (2008). Yusuf-Makagiansar et al. (2002) afirmam que em neutrófilos, subtipo leucocitário majoritário na fração GNC, a expressão dessa integrina é inexistente. Dessa forma, os baixos níveis de VLA-4 detectados para a fração de GNC devem, provavelmente, corresponder aos eosinófilos presentes nessa fração. Exposição aos CPP de 4h/37°C e 4h/50°C por 1 hora, aumentou significativamente a expressão dessa integrina em GNC. Por outro lado, o CPP de 2h/50°C modulou sua expressão de forma contrária, diminuindo significativamente a expressão nas populações de linfócitos e granulócitos.

A integrina VLA-5 é o maior receptor celular para a fibronectina da MEC, dependente da sequência aminoacídica RGD (Nagae et al., 2012), atuando na sinalização da adesão e migração celulares, na angiogênese, bem como na cicatrização de feridas (Li et al., 2009), além do papel fundamental durante o desenvolvimento de mamíferos. Com relação à sua expressão basal, um perfil diferenciado, quando comparado às expressões de LFA-1 e VLA-4, pôde ser observado para linfócitos e GNC, com níveis muito mais baixos, porém coerentes com os previamente obtidos em nosso laboratório para indivíduos saudáveis (Nardin et al., 2008; Corradi-Perini et al., 2010).

Como observado nos resultados obtidos, LFA-1, VLA-4 e VLA-5 exibem diferentes perfis de expressão em indivíduos saudáveis, dependendo da população leucocitária estudada. Entretanto, a expressão de uma molécula não necessariamente demonstra sua capacidade de interagir com ligantes apropriados, intermediando sinais e funções, muitas vezes necessitam ser ativados para desempenharem suas funções.

Embora nesse estudo os linfócitos foram avaliados como um único grupo, é interessante ressaltar que cerca de 70% dos linfócitos que trafegam no sangue periférico pertencem à linhagem T e níveis de expressão de VLA-4 e VLA-5 semelhantes aos aqui observados para uma população não fracionada, independentemente do seu estado de ativação, já foram descritos (Crisa et al., 1996), assim como para populações enriquecidas de linfócitos B (Lemoine et al., 1990) e de células NK (Gismondi et al., 1991).

O conjunto de resultados desta seção indicou que, independente da temperatura empregada, CPP obtidos após digestão mais prolongada (4h) agem como moduladores positivos das integrinas VLA-4 e VLA-5 em leucócitos periféricos, aumentando sua expressão, enquanto aqueles obtidos com menor tempo de hidrólise (2h) apresentam efeito contrário, pois inibiram sua expressão, particularmente de VLA-4, em linfócitos e em granulócitos.

Há, na literatura, relatos de que peptídeos contendo a sequência LDV são potentes inibidores de adesão mediada por VLA-4 (Yusuf-Makagiansar et al., 2002). Já para VLA-5, a mesma informação é dada para peptídeos contendo a sequência RGD (Takagi; Strokovich; Springer, 2003). Interessante, neste contexto, é que ao se estudar com mais detalhes a Tabela 4, observa-se que a concentração dos

aminoácidos leucina, valina, glicina e arginina, presentes nos CPP produzidos e componentes das sequências RGD ou LDV, pouco diferem entre si, em contraste com as quantidades observadas para o ácido aspártico, resultante da oxidação da asparagina que acontece durante a reação. Ou seja, o período de 4h de reação levou à produção de CPP com quantidade de ácido aspártico menor em relação à reação de 2h, assim como a temperatura de 50°C em relação à de 37°C. Coincidência ou não, menor (e significativa) expressão de VLA-4 e de VLA-5 em frações de leucócitos expostos a esses CPP foi obtida, sugerindo que o Ácido Aspártico possa atuar como modulador dessas integrinas. Para esclarecer melhor esta hipótese, experimentos semelhantes usando solução de Ácido Aspártico deveriam ser realizados. Além disso, seria interessante conhecer a sequência de aminoácidos desses CPP, a fim de verificar não só a existência como também a quantidade dos tripeptídeos RGD e LDV nessas frações.

Se os efeitos observados para os CPP na modulação de integrinas fossem confirmados, em conjunto com o fato de que CPP parecem ser resistentes à digestão gastrointestinal (García-Nebot et al., 2010), a hipótese de seu uso como moduladores negativos, por um lado, parece promissora para o tratamento de condições inflamatórias crônicas, tais como na doença de Crohn, onde a ativação e a migração leucocitárias para sítios inflamatórios poderiam ser atenuadas (Ghosh et al., 2003). Benefícios decorrentes da diminuição da expressão ou mesmo inativação dessas integrinas poderiam também estar presentes em outras doenças crônicas, como a esclerose múltipla, asma ou artrite reumatoide (Hyun et al., 2009). Outra situação favorável para o emprego desses CPP seria após um infarto agudo do miocárdio ou um acidente vascular encefálico, onde se observa acúmulo pós-isquêmico de neutrófilos, que danificam os tecidos circunvizinhos (Gahmberg et al., 1999).

Por outro lado, CPP poderiam ser úteis em situações em que seja conveniente aumentar a adesão de integrinas à MEC, como no caso de infecções, por exemplo, onde o aumento da atividade de integrinas no sentido de promover o acúmulo de leucócitos no tecido infectado possa ser vantajoso; outro exemplo poderia ser no estímulo da atividade de linfócitos T citotóxicos e de células NK em pacientes com doenças malignas (Gahmberg et al., 1999), no sentido de eliminar células cancerosas.

4.2.3 Quimiotaxia

Como exposto na revisão deste trabalho, a infiltração leucocitária induzida por fatores quimiotáticos é um evento essencial na resposta do hospedeiro frente à infecção microbiana, resultando em inflamação (Kitazawa et al., 2007). Em paralelo à expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5, um dos objetivos deste trabalho foi o de investigar o efeito desses hidrolisados sobre a mobilização de leucócitos periféricos, explorando o potencial dessas células em responder a gradientes quimiotáticos, usando Câmaras de Boyden como modelo.

É fato que a caseína e o caseinato de sódio são hidrolisados pelo trato gastrointestinal, sendo fragmentados em peptídeos. Entretanto, utilizou-se a caseína como modulador positivo padrão dessa série de experimentos por ser uma proteína reconhecidamente dotada de potente atividade quimiotática sobre neutrófilos e monócitos humanos (Zigmond; Hirsch, 1973; Katagiri et al., 1980; Presibella; Santos; Weffort-Santos, 2007). Inicialmente, usando várias concentrações de caseína, estabeleceu-se aquela de maior efeito sobre a mobilização dos leucócitos e que seria, então, utilizada como o controle positivo. Os CPP foram adicionados ao compartimento inferior das câmaras, separadas do compartimento superior por filtros de policarbonato contendo poros de 5 μm de diâmetro, e a população celular presente no compartimento superior estimulada a migrar por noventa minutos a 37°C. O caseinato de sódio também foi submetido aos mesmos procedimentos técnicos para fins de comparação dos efeitos com aqueles promovidos pelos seus hidrolisados.

Como ilustra a Figura 21, a caseína a 0,25 e 1% promoveu migração de células que diferiu significativamente ($p < 0,05$) daquela observada para o controle (PBSS) e, deste experimento, estabeleceu-se a concentração de 1% para ser usada como modulador quimiotático positivo nos experimentos subsequentes e para a qual os dados seriam normalizados em 100%. Já o caseinato de sódio, em contraste, não apresentou potencial quimiotático, independente da concentração estudada, sendo sua ação semelhante àquela desempenhada pelo PBSS.

Analisando o perfil de ação obtido pelas várias concentrações de caseína sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos, observa-se uma curva com aspecto em forma de sino (Figura 21). Este perfil já era esperado, pois foi descrito como

característico não só para a caseína, mas também para as quimiocinas, as quais, quando submetidas a ensaios semelhantes, também interagem com receptores associados ao complexo proteína G numa relação dose-dependente direta, seguida da diminuição do efeito na presença de concentrações elevadas do ligante (Schall, 1994; Badr et al., 2012).

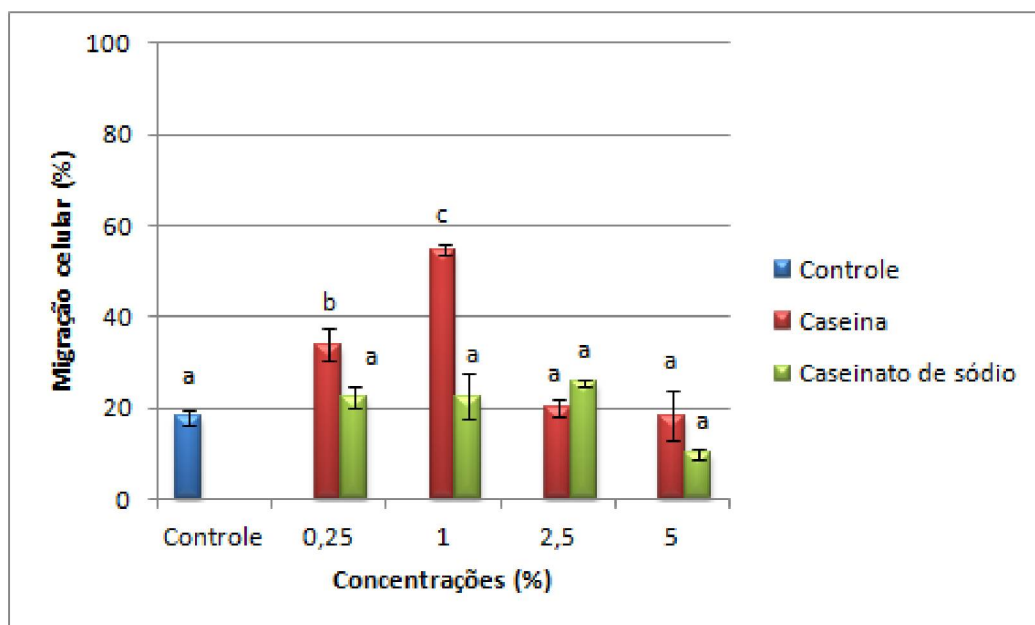


FIGURA 21 - EFEITOS DA CASEÍNA E DO CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS HUMANOS. Leucócitos obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis foram expostos às concentrações indicadas de caseína e caseinato de sódio, adicionadas ao compartimento inferior de câmaras de Boyden, e estimulados a migrar por noventa minutos, a 37°C. As colunas representam a porcentagem média±DP de células recuperadas do compartimento inferior da câmara de Boyden em relação à população controle, exposta a solução salina tamponada com fosfatos. (n=3; letras distintas correspondem à diferença significativa; $p > 0,05$; ANOVA, *post hoc* Tukey).

Quando leucócitos humanos foram expostos a soluções a 1% dos diferentes CPP na mesma técnica de migração (Figura 22), comportamento estimulador da quimiotaxia semelhante ao exercido pela caseína, mas não tão intenso, foi observado, com $58,11 \pm 8,0$ e $53,13 \pm 3,91\%$ das células sendo recuperadas para os

tratamentos correspondentes aos CPP 4h/37 e 4h/50 °C, respectivamente, enquanto observou-se uma recuperação de somente $33,02 \pm 1,66\%$ das células para a população controle ($p < 0,05$).

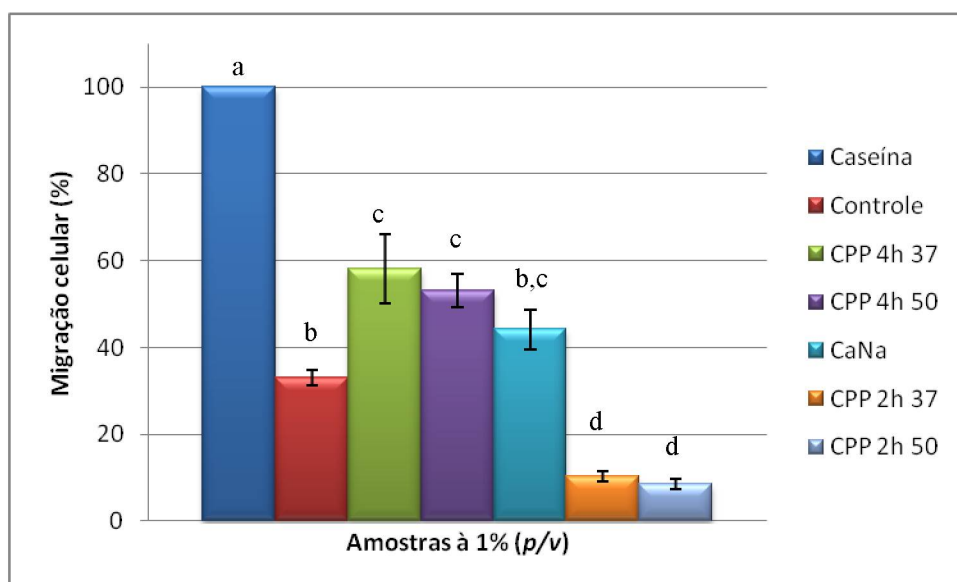


FIGURA 22 - EFEITOS DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE A QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS HUMANOS. Leucócitos obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis foram expostos às concentrações indicadas de caseinofosfopeptídeos (CPP) obtidos após 2 e 4h de hidrólise, à 37 e 50 °C, adicionadas ao compartimento inferior de câmaras de Boyden, e estimulados a migrar por noventa minutos, à 37°C. As colunas representam a porcentagem média \pm DP de células recuperadas do compartimento inferior da câmara de Boyden em relação à caseína 1%, usada como modulador quimiotático positivo ($n=3$; letras distintas correspondem a diferença significativa; $p > 0,05$; $p > 0,05$, ANOVA, *post hoc* Tukey). Controle: PBSS. CaNa: caseinato de sódio.

Quanto aos CPP obtidos após 2 horas de hidrólise, o comportamento celular foi contrário ao gradiente, com um número de células recuperadas menor do que o observado para a população controle, com valores de somente $10,37 \pm 1,23$ e $8,51 \pm 1,1\%$, respectivamente, indicando serem bloqueadores não só da quimiotaxia de leucócitos, mas também de seu movimento espontâneo, denominado

quimiocinese. Neste contexto, quando leucócitos são colocados sobre um substrato adequado, na ausência de qualquer substância estimulante, eles migram ao acaso, em várias direções e de forma persistente (movimento ao acaso ou randômico) (Devreotes; Zigmond, 1988). Este foi o comportamento dos leucócitos expostos ao PBSS em nossos experimentos.

Ao adicionar-se um agente estimulante, isto é, uma substância quimiotática ao meio, como a caseína, por exemplo, essas células terão essa motilidade acelerada. Entretanto, caso não se possa precisar o local da fonte do estímulo (ausência de gradiente de concentração), esses movimentos acelerados também ocorrerão ao acaso. Este aumento de velocidade na motilidade é denominado quimiocinese (Keller, et al. 1977).

A interação entre quimiotaxia e quimiocinese na resposta inflamatória é de extrema importância, pois a primeira leva os leucócitos ao local da lesão, enquanto a outra permite seu acúmulo. Ambas são necessárias ao exercício das multifunções celulares que concorrem para a morte (no caso de patógenos) e eliminação do agente invasor, assim como a reparação tecidual local (Wilkinson, 1980).

Assim, esses experimentos permitiram observar que os hidrolisados do caseinato de sódio obtidos por digestão com tripsina exercem efeitos moduladores sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos e que, dependendo do tempo no qual esses peptídeos são obtidos, independente da temperatura empregada, os efeitos podem ser opostos, atraindo (moduladores positivos) ou repelindo (moduladores negativos) essas células.

Interessante notar que não há estudos envolvendo CPP em quimiotaxia ou sistemas moduladores como o aqui apresentado. Ainda, estudos envolvendo hidrolisados de caseína (não caracterizados como CPP) e quimiotaxia ainda são escassos e os resultados inconsistentes mesmo diante do fato de que as proteínas do soro do leite são amplamente conhecidas por modularem as respostas inflamatória e imunológica tanto *in vitro* como *in vivo* (Badr et al., 2012).

Kitazawa et al. (2007), por exemplo, ao estudarem hidrolisados da β -caseína obtidos com diferentes enzimas, incluindo a tripsina, sobre a mobilização de macrófagos de ratos e monócitos humanos, descreveram atividade quimiotática moderada para a β -caseína intacta e um aumento significativo na quimiotaxia só foi observado após o processo de hidrólise com proteínase K, actinase E e papaína.

Esses autores também não encontraram atividade quimiotática para neutrófilos humanos e linfócitos T, indicando que esses hidrolisados exercem atividade preferencial em monócitos/macrófagos de ratos e humanos. Os hidrolisados desse grupo de pesquisadores foram digeridos por 24h, a 25 e 37°C, com taxa de razão enzima/substrato de 5:100, tempo muito superior ao empregado no nosso trabalho, o que pode resultar na obtenção de peptídeos distintos. Isso sugere que a enzima utilizada no processo de obtenção de hidrolisados, bem como o tempo, a temperatura ou, enfim, a metodologia adotada interfere nos fragmentos gerados, podendo apresentar diversidade de ação com referência à atividade quimiotática.

A utilização de caseinato de sódio, matéria-prima inicial aqui utilizada, pressupõe fragmentos de α -, β -, κ - e γ -caseína nos hidrolisados obtidos. A literatura cita que peptídeos de β -caseína, também conhecidos por β -casomorfina, são os maiores peptídeos opióides da caseína, enquanto que os peptídeos da κ -caseína (casoxinas) apresentam comportamento antagonista ao opióide (MILLS et al., 2011). Importante destacar que as β -casomorfina são resistentes a ação de enzimas gastrointestinais e contribuem significativamente para a produção de muco, o qual desempenha papel protetor no intestino, prevenindo a aderência de patógenos na superfície intestinal (Mills et al., 2011). Interessante aqui seria conhecer as frações de β - e κ -caseína em cada peptídeo obtido para sabermos se a função quimiotática observada com os CPP de 4 horas de hidrólise poderia ter relação com o teor de β -casomorfina, bem como se os CPP de 2 horas de hidrólise apresentam maior teor de casoxinas.

Mesmo que o efeito quimiotático apresentado pelos CPP com 4 horas tenha sido significativo em relação ao controle, é preciso notar que nenhum deles se mostrou superior ao efeito demonstrado pela caseína, como já citado. É conhecido que os fagócitos respondem a uma variedade de quimioatraentes, provavelmente via receptores específicos na superfície celular (Katagiri et al., 1980). Neste contexto, a presença de receptores para a caseína já foi descrita na superfície tanto de granulócitos como de monócitos (Lewis; Van Epps, 1983). Além disso, a caseína é uma proteína láctea com ação opióide (Meisel; Frister; Sehlimme, 1989; Mills et al., 2011), com efeitos inibitórios descritos sobre as respostas imunes celular e mediada por anticorpos, na atividade de células NK, na expressão de citocinas e na

atividade fagocítica (Szabo et al., 2002), decorrentes de sua interação com diferentes receptores opióides.

Quimiotaxia é um comportamento celular em que um gradiente extracelular é detectado por receptores de superfície celular e, então, traduzidos em movimento celular direcional (Jin; Hereld, 2006). Esse movimento celular direcional depende de um grupo de substâncias definidas como *fatores quimiotáticos* (FQ), ou ligantes capazes de induzir uma locomoção direcional a favor ou contra um gradiente de concentração (Wilkinson; Haston, 1988).

Se há um ligante, é necessário que a célula em questão apresente um ou mais receptores que permitam o acoplamento deste ligante. Dessa forma, os CPP de 4 horas de digestão demonstraram comportamento de FQ, pois os resultados mostraram que ambos foram capazes de promover a quimiotaxia de leucócitos humanos a favor de seus gradientes, implicando que essas células são dotadas de um ou mais receptores que permitem sua interação.

Nas últimas três décadas, numerosos quimioatratantes foram identificados, incluindo os "clássicos", tais como o peptídeo quimiotático bacteriano α MLF, C5a, caseína, fator de LTB4 e ativador de plaquetas, bem como a superfamília de quimiocinas. Todos esses quimioatratantes ativam o complexo heterotrimérico da proteína G, expresso não só em células de origem hematopoiética, mas também em outros tipos celulares (Zigmond, 1978; Wilkie et al., 1991; Kato et al., 2002).

Além do seu papel na infecção e na inflamação, há evidências crescentes do envolvimento de um ou mais quimioatratantes no tráfico de linfócitos, na coagulação, na hematopoiese, na cicatrização, alergia, aterogênese, angiogênese e malignidade. Assim, o âmbito de pesquisas na aplicação de receptores quimioatratantes tem expandido muito devido à descoberta de que muitos receptores de quimiocinas acoplados a proteína G também servem como co-receptores para o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Zaitseva; Peden; Golding, 2003; Kitazawa et al., 2007).

Os receptores acoplados a proteína G respondem através de uma sucessão de interações e desacoplamentos das subunidades α , β e γ até a associação final com uma enzima-alvo, a qual ativa uma ou mais moléculas sinalizadoras, também denominadas mensageiros secundários. Como regra, a transdução de sinal desses receptores se dá pela hidrólise do fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em seus

mensageiros intermediários, o inusitol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DG). O IP_3 mobiliza as reservas intracelulares de Ca^{2+} , levando a um aumento transitório de Ca^{2+} intracelular, enquanto o DG estimula a fosfoquinase C, que através da fosforilação de uma infinidade de moléculas efetoras promove uma variedade de respostas celulares (Snyderman; Goetzl, 1981; Ben-Baruch; Michiel; Oppenheim, 1995; Jin; Hereld, 2006). Ou seja, a ativação de um mecanismo de transdução direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de uma ou mais atividades celulares, incluindo os mecanismos observados nas respostas inflamatórias como a mobilização de Ca^{2+} intracelular, rearranjo do citoesqueleto, exocitose, indução da expressão de receptores de superfície, mudanças na adesão e agregação, produção de superóxidos, aumento da atividade metabólica e quimiotaxia (Zigmond, 1978; Jin; Hereld, 2006).

Portanto, é possível que os efeitos observados pelos CPP de 4 horas de hidrólise sobre a mobilização de leucócitos humanos envolvam mecanismos relacionados à complexa cascata da quimiotaxia, a qual depende do tipo celular envolvido, do ligante, da estrutura e configuração dos receptores, da proteína G envolvida e das diferentes enzimas-alvo que são ativadas no processo, além da possibilidade de serem resultantes da somatória de respostas moleculares causadas por cada um de seus constituintes isoladamente.

Estudos mais aprofundados, incluindo definição de receptores, devem ser realizados por meio de ensaios experimentais mais específicos, que possam esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos, dos quais aplicações funcionais possam ser exploradas. Também faz-se necessário entender o mecanismo de ação pelo qual os CPP com 2h de hidrólise inibiram o movimento direcional. Assim, seria interessante também, comparar o efeito dos CPP de 2 horas de digestão com aqueles promovidos por drogas clássicas de inibição quimiotática.

A capacidade de modulação da quimiotaxia de leucócitos humanos pela primeira vez relatada, associada ao já amplo espectro de atividades descritas para os CPP torna-se relevante no contexto em que os mesmos podem também ser aplicados como ingredientes funcionais para auxiliar na defesa do hospedeiro contra quadros inflamatórios.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Proteínas e peptídeos lácteos são capazes de exercer atividades antibacterianas (Mills et al., 2011) e, embora antibióticos estejam disponíveis para o tratamento de infecções microbianas, os peptídeos derivados da caseína parecem ser capazes de eliminar alvos celulares rapidamente, com amplo espectro de atividade. Neste sentido, a literatura relata que peptídeos antimicrobianos agem contra bactérias gram-positivas e negativas, leveduras e filamentos fúngicos, podendo ser promissores para os eventos que envolvem a resistência às drogas (Phelan et al., 2009a).

Com o objetivo de avaliar se os CPP produzidos pela metodologia proposta neste trabalho seriam dotados de habilidade antibacteriana como já amplamente descrito para outras moléculas lácteas, usou-se o teste de susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo, o qual permite avaliar, de forma quantitativa, a atividade *in vitro* de determinado agente frente a um isolado bacteriano.

A atividade antimicrobiana foi testada, então, com cepas de *E. coli* e de *S. enteritidis* usando diversas concentrações tanto de caseinato de sódio como das frações de CPP. Os resultados estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 23 e 24.

Em relação à atividade contra a *E. coli* (Figura 23) observou-se que a 2%, o caseinato de sódio apresentou maior índice inibitório, com $69,3 \pm 1,92\%$ de atividade, com diferença significativa comparado à todos os CPP testados ($p > 0,05$); CPP 2h/37°C e 50°C apresentaram $60 \pm 0,18\%$ e $55,1 \pm 1,59\%$; o CPP 4h/37°C apresentou $51,57 \pm 0,03\%$ de atividade inibitória, e o CPP 4h/50°C apresentou a menor atividade inibitória, com $44,23 \pm 1,55\%$, sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) dos demais citados. Interessante destacar que, apenas nessa concentração, observa-se claramente que quanto mais digerido foi o CPP, menor sua ação inibitória sobre *E. coli*.

Para a concentração de 1%, os valores encontrados foram: $50,88 \pm 2,86\%$ para o caseinato de sódio; $56,22 \pm 0,7\%$ para o CPP 2h/37°C; $49,87 \pm 4,63\%$ para o CPP 2h/50°C; $55,83 \pm 3,27\%$ para o CPP 4h/37°C e $46,33 \pm 4,63\%$ para o CPP 4h/50°C.

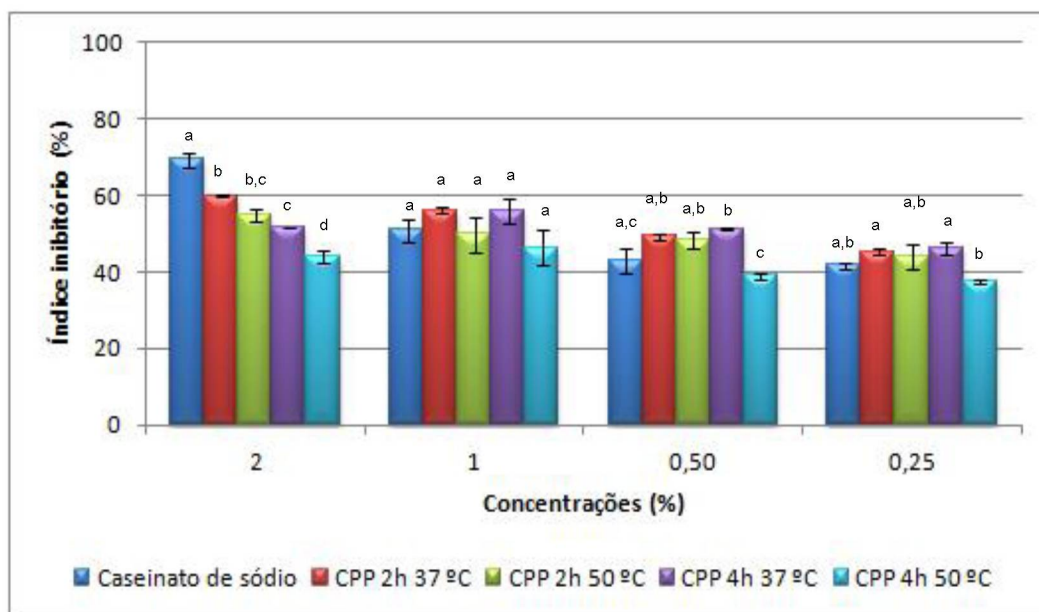


FIGURA 23 - EFEITOS DO CASEINATO DE SÓDIO E DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ESCHERICHIA COLI PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO. (n=2; letras distintas correspondem à diferença significativa na mesma concentração; $p > 0,05$; ANOVA, *post hoc* Tukey).

Em relação à concentração de 0,5%, observou-se que o CPP 4h/37°C apresentou o maior índice inibitório ($p < 0,05$), com $51,34 \pm 0,28\%$. Os CPP 2h/37°C e 50°C, bem como o caseinato de sódio, apresentaram índice inibitório de $49,21 \pm 0,8\%$, $48,25 \pm 2,13\%$ e $43,04 \pm 3,25\%$, respectivamente. O CPP 4h/50°C apresentou $38,92 \pm 0,92\%$ de índice inibitório, sendo esse o menor valor ($p < 0,05$) comparado aos demais citados nessa concentração.

Para a concentração de 0,25%, os resultados encontrados foram: $41,76 \pm 0,75\%$ para o caseinato de sódio, $45,38 \pm 0,78\%$ para o CPP 2h/37°C, $44,14 \pm 3,15\%$ para o CPP 2h/50°C, $46,29 \pm 1,77\%$ para o CPP 4h/37°C e $37,3 \pm 0,62\%$ para o CPP 4h/50°C. Observa-se que o CPP 4h/50°C foi o hidrolisado que apresentou o menor índice de inibição, em todas as concentrações, sendo estatisticamente diferente dos demais hidrolisados ($p < 0,05$).

Para a cepa de *S. enteritidis* (Figura 24), o caseinato de sódio, bem como todos os CPP apresentaram menor atividade antimicrobiana quando a ação inibitória é comparada àquela apresentada para a *E. coli*. Na concentração de 2%, o maior

índice inibitório foi apresentado pelo CPP 2h/50°C, com 54,29±1,26%, seguido pelo caseinato de sódio com 46,61±1,66%, CPP 4h/37°C com 42,01±1,2%, CPP 4h/50°C 33,68±1,53% e com menor atividade, o CPP 2h/37°C, com 24,63±1,43%. Interessante destacar que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as amostras nessa concentração.

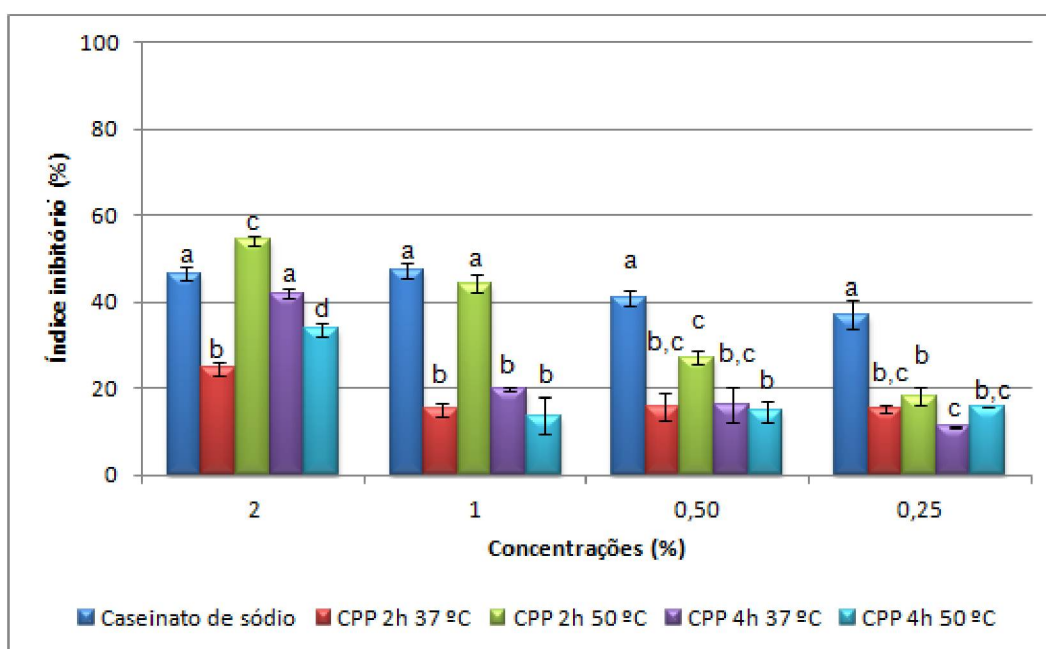


FIGURA 24 - EFEITOS DO CASEINATO DE SÓDIO E DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SALMONELLA ENTERITIDIS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO (n=2; letras distintas correspondem à diferença significativa na mesma concentração; $p > 0,05$; ANOVA, *post hoc* Tukey).

Na concentração de 1%, o maior índice inibitório foi apresentado pelo caseinato de sódio, com 47,41±1,73%, seguido do CPP 2h/50°C com 44,26±1,97%. Os demais CPP apresentaram resultados menos expressivos: 19,86±0,37% para o CPP 4h/37°C; 15,2±1,43% para o CPP 2h/37°C e 13,68±4,21% para o CPP 4h/50°C.

À 0,5%, o caseinato apresentou a maior índice inibitório, com 41,01±1,86%, diferindo significativamente dos CPP. O CPP com maior atividade foi o 2h/50°C com

27,18±1,63%. Os demais CPP apresentaram: 16,25±3,98% para o CPP 4h/37°C, 15,62±3,14% para o CPP 2h/37°C e 14,8±2,35% para o CPP 4h/50°C.

Para a menor concentração testada, 0,25%, novamente o caseinato de sódio apresentou o maior índice inibitório, com 37,17±3,21%, diferindo significativamente dos demais ($p < 0,05$). Conforme resultado da concentração anterior, o CPP 2h/50°C foi o que apresentou maior índice inibitório, com 18,17±2,1%, seguido do CPP 4h/50°C com 15,69±0,06%, do CPP 2h/37°C com 15,32±1,05% e 11,23±0,13% para o CPP 4h/37°C. Ressalta-se que, para esse ensaio com *S. enteritidis*, o CPP que apresentou maior índice inibitório em todas as concentrações foi o CPP 2h/50 °C.

Ainda não está claro o mecanismo de ação pelo qual os CPP apresentam atividade contra bactérias gram-negativas. Postula-se que o mesmo possa atuar similarmente a outros peptídeos bioativos lácteos. A atividade antimicrobiana da lactoferricina, hidrolisado derivado da lactoferrina, e análogos sintéticos parecem ser dependentes da ligação com a superfície bacteriana (Odell et al., 1996), envolvendo a rede de cargas positivas dos peptídeos e as cargas negativas da membrana bacteriana. Esses peptídeos catiônicos demonstram eliminar microrganismos sensíveis pela indução no aumento na permeabilidade da membrana celular. Parece que o tamanho molecular também desempenha papel benéfico na atividade antimicrobiana, pois pode facilitar o acesso a sítios alvo na superfície bacteriana (Meisel, 1997; Hartmann; Meisel, 2007).

Por outro lado, o mecanismo de ação da atividade antibacteriana do peptídeo α_{s2} -caseína f(183-207) indica atuação por diferentes sítios de ligação para com as bactérias. Os sítios de ligação iniciais do peptídeo referido foram com o ácido lipoteicóico em bactérias gram-positivas e lipolissacarídeos em bactérias gram-negativas. Esse peptídeo foi capaz de permeabilizar as membranas externa e interna das bactérias, gerando poros e condensando o citoplasma de bactérias gram-negativas (Hoek et al., 1997; López-Expósito; Amigo; Recio, 2008).

A molécula de K-caseína é, também, precursora de alguns peptídeos antimicrobianos para bactérias gram-negativas e gram-positivas. Kapacina, que corresponde ao caseinomacropéptido (CMP), é frequentemente citada na literatura por apresentar ação antimicrobiana. Modelos moleculares e predições da estrutura secundária de kapacina revelaram que o peptídeo contém resíduos que podem formar uma estrutura de hélice anfipática (Odell et al., 1996; López-Expósito; Amigo;

Recio, 2008). A fosforilação da kapacina pode produzir mudança na conformação do peptídeo por repulsão eletrostática ou por ligação a metais divalentes, que desta forma, pode adotar uma conformação específica para interagir com a membrana celular bacteriana (López-Expósito; Amigo; Recio, 2008).

Conforme exposto, diferentes mecanismos podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana dos CPP produzidos nesse trabalho. Assim, a elucidação da composição dos resíduos dos CPP obtidos poderia facilitar o entendimento do mecanismo de ação observado nesta série de experimentos.

4.4 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

Devido ao reconhecido efeito dos radicais livres na patogênese de várias doenças humanas, com consequências, muitas vezes, devastadoras, a procura por substâncias que possam atenuar ou mesmo impedir suas ações tem se ampliado, assim como os métodos para avaliar o potencial antioxidante dessas substâncias, de origem natural ou sintética.

Antioxidantes desempenham papel importante na manutenção da imunidade e proteção contra danos de radicais livres no corpo humano e sua atividade não pode ser mensurada diretamente, mas através dos seus efeitos sobre um substrato ou sistema passível de ser monitorado.

Muitos métodos e modos de expressar a atividade antioxidante de substâncias de natureza diversa têm sido utilizados, onde o efeito de várias concentrações é comparado ao efeito exercido por uma substância de referência, como as vitaminas C ou E, ou mesmo um composto puro, como os flavonoides quercetina e rutina.

Os métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante são muito sensíveis ao ambiente químico em que eles ocorrem, particularmente, na concentração de oxigênio, presença de metais de transição e de numerosos compostos 'redox' ativos (Anderson; Phillips, 1999). Dessa forma, vários testes podem ser utilizados como, por exemplo, os sistemas xantina-xantina oxidase (Alves et al., 2010), peroxidação do ácido linolêico (Jayaprakasha; Singh Sakariah, 2001), o método do DPPH (Choi et al., 2002), do fosfomolibdênio (Prieto; Pineda; Aguilar,

1999) ou o de substâncias reativas aos produtos de oxidação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Hodges et al., 1999; Morais et al., 2006).

Para avaliar fontes alternativas de potentes antioxidantes, o caseinato de sódio e seus CPP foram testados quanto a sua capacidade antioxidante usando dois sistemas com princípios distintos, cujos resultados estão a seguir.

4.4.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

O ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio é um método quantitativo para determinação da atividade antioxidante, que, além de ser validado quanto à reprodutibilidade e linearidade, apresenta execução simples e baixo custo, podendo, portanto, ser utilizado na rotina industrial ou laboratorial (Prieto; Pineda; Aguilar, 1999).

A metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999) aqui empregada é baseada na redução do Mo^{+6} para Mo^{+5} , levando a formação de um complexo de coloração verde em pH ácido formado de fosfato e Mo^{+5} , medido em 695 nm, sendo atribuída a essa intensidade a atividade antioxidante total sobre as amostras avaliadas.

Considerando a vitamina C como padrão de referência e para qual se atribuiu o valor de 100%, a atividade antioxidante do caseinato de sódio apresentou melhor desempenho (AAR) em relação aos seus CPP, com $16,46 \pm 0,33\%$ em relação à vitamina C (Figura 25). Para os CPP, os resultados obtidos foram semelhantes, sendo $4,2 \pm 0,39\%$ para o CPP 2h/37°C, $3,9 \pm 0,19\%$ para o CPP 2h/50°C, $4,78 \pm 0,17\%$ para o 4h/37°C, à exceção do CPP 4h/50°C, com somente $2,04 \pm 0,18\%$ de AAR à vitamina C.

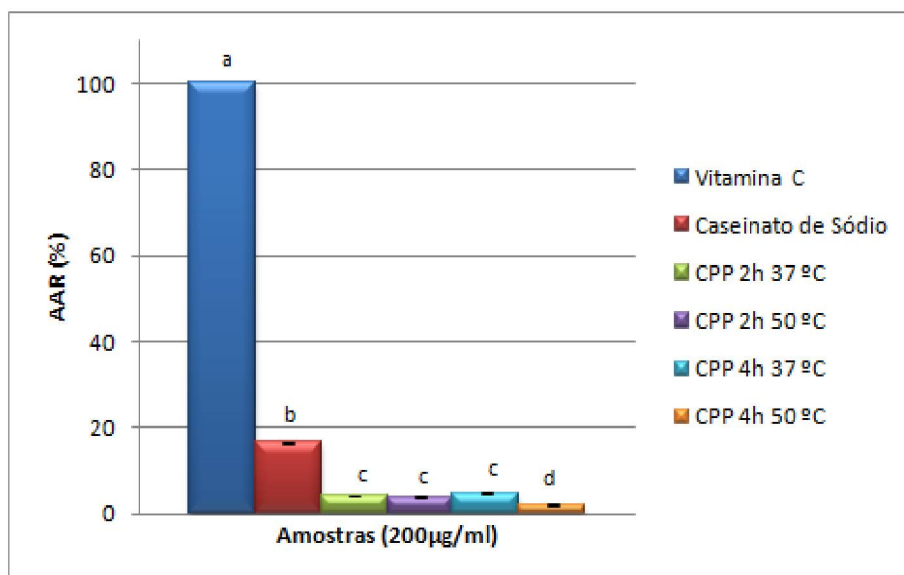


FIGURA 25 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CASEINATO DE SÓDIO E SEUS HIDROLISADOS RELATIVA À VITAMINA C PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO MOLIBDÊNIO. Caseinato de sódio e seus hidrolisados enzimáticos (CPP) foram submetidos à análise da atividade antioxidante pelo método de formação do complexo molibdênio, tendo como referência a vitamina C, para qual a atividade antioxidante atribuída foi 100%, conforme descrito em Material e Métodos. Cada coluna representa a média±DP da atividade antioxidante em relação à atividade desempenhada pela vitamina C (AAR), usada como padrão (200 µg/mL), obtida de três ensaios independentes, realizados em triplicada (n=3; letras diferentes representam diferença significativa em relação ao padrão; $p>0,05$, ANOVA, *post hoc* Tukey).

Quando comparados à rutina, flavonoide de reconhecida ação antioxidante, o caseinato se mostrou mais ativo, com $81,64\pm 1,63\%$ (Figura 26). Com relação aos hidrolisados, os resultados também foram mais expressivos: $20,85\pm 1,93\%$ para o CPP 2h/37°C, $18,89\pm 1,63\%$ para o CPP 2h/50°C, $23,7\pm 0,82\%$ para o 4h/37°C e $10,16\pm 0,92\%$ para o CPP de 4h/50°C, recapitulando o perfil anterior, com valores ainda menores, indicando que maior tempo de hidrólise em temperatura mais elevada comprometem a capacidade antioxidante de um CPP.

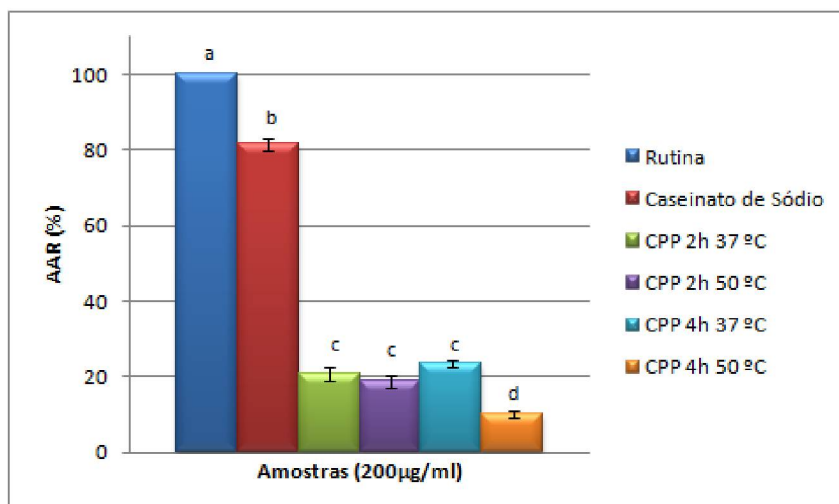


FIGURA 26 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CASEINATO DE SÓDIO E SEUS HIDROLISADOS RELATIVA À RUTINA PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO MOLIBDÊNIO. Caseinato de sódio e seus hidrolisados enzimáticos (CPP) foram submetidos à análise da atividade antioxidante pelo método de formação do complexo molibdênio, tendo como referência a rutina, para qual a atividade antioxidante atribuída foi 100%, conforme descrito em Material e Métodos. Cada coluna representa a média±DP da atividade antioxidante em relação à atividade desempenhada pela rutina (AAR), usada como padrão (200 µg/mL), obtida de três ensaios independentes, realizados em triplicada (n=3; letras diferentes representam diferença significativa em relação ao padrão; $p > 0,05$, ANOVA, *post hoc* Tukey).

4.4.2 Espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Esse método fundamenta-se na medida da lipoperoxidação pela produção de espécies reativas ao TBA. A mensuração do malonaldeído (MDA), substância produzida neste processo, permite avaliar os efeitos do estresse oxidativo induzido e da proteção da lipoperoxidação pelas substâncias antioxidantes que possam estar presentes no material analisado (Hodges et al., 1999). Essa mensuração é realizada pela reação do TBA com o MDA, em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, gerando um cromóforo rosa que pode ser mensurado em espectrofotômetro (Dawn-Linsley et al., 2005).

Como demonstrado na Figura 27, a vitamina E, o BHT e a quercetina apresentaram ação semelhante, com valores de $70,13 \pm 2,49\%$; $64,63 \pm 5,99\%$, e

62,61±4,59% de IA, respectivamente, mas diferiram significativamente da vitamina C, para a qual observou-se o valor de 45,34±1,56% de IA. Já o caseinato de sódio e seus CPP apresentaram resultados similares aos obtidos pela vitamina E, BHT e quercetina.

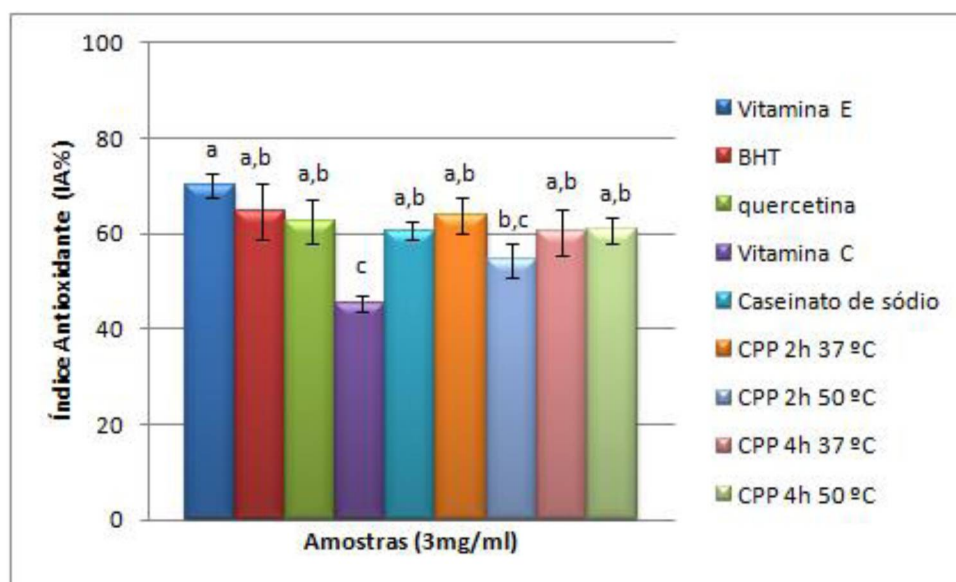


FIGURA 27 - ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CASEINATO DE SÓDIO E DE CASEINOFOSFOPEPTÍDEOS PELO TESTE DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS). Caseinato de sódio e seus hidrolisados enzimáticos (CPP) foram submetidos à análise da atividade antioxidante pelo método TBARS, utilizando como padrões as vitaminas E e C, o BHT e a quercetina, conforme descrito na sessão de Material e Métodos. As colunas representam a porcentagem média de expressão ± DP (n=3; letras distintas correspondem à diferença significativa; $p > 0,05$, ANOVA, *post hoc* Tukey).

Nesta série de experimentos, os CPP produzidos por hidrólise do caseinato de sódio demonstraram ser dotados de capacidade antioxidante, contudo, observou-se variação de intensidade de acordo com a metodologia empregada, indicando sensibilidade distinta entre os testes. Isso pode ser explicado pela diferença nos mecanismos de reações envolvidos, onde há interação entre os compostos e os reagentes destas técnicas, apresentando maior ou menor afinidades entre eles, conforme relatos da literatura (Laguerre; Lecomte; Villeneuve, 2007; Power;

Jakeman; FitzGerald, 2013). Como este fato não é desconhecido, é neste contexto que foi atendido à recomendação do uso de, pelo menos, dois métodos com princípios distintos (Sakanaka et al., 2005).

Proteínas, peptídeos e aminoácidos estão no rol das substâncias que contribuem para a defesa do organismo. Peptídeos e aminoácidos presentes no sangue não só contribuem com aproximadamente 20% de atividade antioxidante no plasma, bem como sua constituição aminoacídica fornece substratos para a síntese de enzimas antioxidantes como a GSH (Power; Jakeman; FitzGerald, 2013).

A literatura refere que o principal componente responsável para a quelação de metais de transição na caseína e seus CPP é a alta concentração de resíduos de fosfoserina, que apresenta um domínio polar aniônico em proximidade à cadeia peptídica, o qual, por sua vez, é favorável ao sequestro de metais catiônicos (Díaz et al., 2003). Ainda, esses resíduos catalisam a oxidação do ferro da forma ferrosa para o estado férrico, formando assim, um complexo de ferro-fosfoproteína altamente estável (Kitts, 2005).

Kitts (2005) refere que grupos fosfato ligados ou não à serina, têm menor efeito contra a oxidação em comparação com caseínas fosforiladas, sugerindo assim que os grupos fosfoserina dos CPP reduzem o dano oxidativo provocado por radicais livres e por ferro ferroso. Ainda, a observação das atividades antioxidantes entre diferentes derivados de caseína com proporções similares de fósforo sugere que a quelação por grupos fosfoseril não é o único mecanismo antioxidante. Em menor proporção, alguns autores sugerem grupos não fosforilados, como Glu e Asp, como responsáveis pela inibição da peroxidação lipídica (Díaz et al., 2003). Outros autores também destacam presença importante da histidina, lisina, prolina, tirosina (Díaz; Decker, 2004; Kim; Jang; Kim, 2007), metionina e arginina (Sarmadi; Ismail, 2010; Power; Jakeman; FitzGerald, 2013) com ação anti-radicais livres.

Apesar disso, a atividade antioxidante não depende apenas da presença de resíduos de aminoácidos específicos, mas também da localização dos aminoácidos dentro da sequência peptídica. Em geral, é provável que a atividade antioxidante de proteínas alimentares e derivados peptídicos seja determinada pela ação sinérgica de alguns ou de todos os mecanismos detalhados acima (Laguerre; Lecomte; Villeneuve, 2007).

Deve-se ressaltar que, apesar do caseinato de sódio apresentar propriedades antioxidantes, a sua adição aos alimentos não é prática por não ser solúvel em pH próximo de 4,6. Além disso, sua proteína pode afetar os parâmetros de qualidade dos alimentos, tais como textura e cor (Díaz; Decker, 2004). Caseinofosfopeptídeos constituem, então, uma opção para prevenir a rancificação em alimentos sem afetar outros parâmetros de qualidade (Phelan et al., 2009b).

O efeito antioxidante observado com hidrolisados de caseína e CPP também foi descrito por outros, com resultados semelhantes, onde inibiram em até 70% a peroxidação lipídica na carne moída, por exemplo, demonstrando que podem ser úteis na prevenção rancificação em produtos cárneos, aumentando assim sua vida útil (Sakanaka et al., 2005). Díaz e Decker (2004) referem que hidrolisados com aproximadamente 1000 Da parecem ser ainda mais efetivos na ação anti-radicalar.

Os resultados desse trabalho sugerem que os CPP podem ser uma fonte de antioxidante natural para vários modelos alimentares como já sugerido por outros (Sakanaka et al., 2005), pois podem melhorar a estabilidade oxidativa dos alimentos, além de adicionar valor aos alimentos tradicionais, naturais e orgânicos (Díaz et al., 2003; Díaz; Decker, 2004) ou mesmo levar ao desenvolvimento de novos produtos para a promoção da saúde e prevenção de doenças.

É conhecido que o envelhecimento é associado com um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição de antioxidantes plasmáticos e celulares que, ao longo do tempo, podem levar ao aumento do estresse oxidativo, acelerando o processo de envelhecimento e a susceptibilidade de doenças relacionadas com o envelhecimento (Power; Jakeman; FitzGerald, 2013). Dessa forma, o consumo de CPP como fonte de antioxidantes pode constituir uma estratégia efetiva para atenuar os efeitos do envelhecimento.

E, por conseguinte, um peptídeo bioativo não precisa necessariamente ser absorvido para apresentar ação antioxidante. A ligação a um receptor intestinal pode ser suficiente para desencadear a resposta (Power; Jakeman; FitzGerald, 2013). Peptídeos antioxidantes podem, também, ter efeito biológico no trato gastrointestinal, reduzindo danos oxidativos. Interessante seria, então, avaliar os efeitos que esses CPP induziriam em métodos de cultivo usando linhagens intestinais.

6 CONCLUSÃO

Uma das mais importantes áreas de interesse referentes às proteínas e peptídeos alimentares é estabelecer as relações entre estrutura e funcionalidade desses componentes.

Nesse trabalho observou-se que pequenas mudanças nos métodos de obtenção dos CPP levam a diferenças significativas na composição físico-química e, principalmente, nas atividades biológicas.

Os CPP apresentam tamanho molecular e composição aminoacídica de importância nutricional, principalmente por favorecerem a síntese proteica e, principalmente, por serem ricos em ácido glutâmico, são potentes moduladores do sistema imunológico. Ainda, são ricos em minerais como cálcio e fósforo, importantes para a saúde óssea.

O conjunto de resultados apresentado nesse trabalho revelou alguns aspectos interessantes e desconhecidos com relação à atividade inflamatória de CPP derivados do caseinato de sódio, particularmente na expressão de moléculas de adesão e na atividade migratória de leucócitos periféricos humanos, células que participam direta e ativamente dessa ação. Independente da temperatura empregada, CPP obtidos por hidrólise de 4h agem como moduladores positivos das integrinas VLA-4 e VLA-5 em leucócitos periféricos e na quimiotaxia, enquanto aqueles obtidos com menor tempo de digestão (2h) apresentam efeito contrário, inibindo a expressão, particularmente de VLA-4 em linfócitos e granulócitos e também na quimiotaxia (modulação negativa).

Ainda, os CPP, apresentaram relevantes atividades antimicrobianas contra gram-negativos, em especial, o CPP 2h/50°C contra *S. enteritidis*.

Todos os CPP apresentaram ação antioxidante importante, similares aos conhecidos antioxidantes vitamina E e BHT.

Assim, os resultados deste trabalho constituem uma base preliminar, mas rica de dados que incentiva não só a aplicação desses CPP como alimento alternativo ou como suplemento em situações especiais que envolvem pacientes desnutridos e imunodeprimidos ou que envolvem o comprometimento gastrintestinal decorrente de

inflamações, mas estimula investigações que visem contribuir com a segurança alimentar e nutricional desses grupos.

REFERÊNCIAS

- Adamson, N.J.; Reynolds, E.C. Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. **Biotechnol Bioeng**, 1995; 45(3):196-204.
- Adamson, N.J.; Reynolds, E.C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity. **Enzyme Microb Technol**, 1996; 19(3):202-207.
- Adler-Nissen, J. **A Review of Food Protein Hydrolysis Specific Areas: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Elsevier Applied Science Publications, New York, 1986; 57-131.
- Alves, C.Q.; David, J.M.; Bahia, M.V.; Aguiar, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim Nova**. 2010; 33(10):2202-10.
- Akca, O., Doufas, A.G.; Sessler, D.I. Use of selective opiate receptor inhibitors to prevent postoperative ileus. **Minerva Anesthesiol**, 2002; 68(4):162-5.
- Anderson D, Phillips B.J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food Chem Toxicol** 1999; 37(9-10):1015-25.
- Antunes, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro do leite bovino**. Barueri, SP: 2003, 150 f.
- Association of Official Analytical Chemists. Horwitz W. (Ed.) **Official methods of analysis of the association of analytical chemists**. 15 ed. Arlington: AOAC Inc., 1990; 2:1167-74.
- Arsenio, I.; Caronna, S.; Cioni, F.; Dall'aglio, E. Homo sapiens and milk: a valuable food in the past and in the future. **Mediterr J Nutr Metab**, 2010; 3(2):99-103.
- Autio, A.; Jalkanen, S.; Roivainen, A. Nuclear imaging of inflammation: homing-associated molecules as targets. **EJNMMI research**, 2013; 3(1):1-7.
- Badr, G.; Ebaid, H.; Mohany, M.; Abuelsaad, A.S. Modulation of immune cell proliferation and chemotaxis towards CC chemokine ligand (CCL)-21 and CXC chemokine ligand (CXCL)-12 in undenatured whey protein-treated mice. **J Nutr Biochem**, 2012; 23(12):1640-6.
- Balbino, C.A.; Pereira, L.M.; Curi, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Cienc Farm**, 2005; 41(1):27-51.
- Ben-Baruch, A.; Michiel, D.F.; Oppenheim, J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **J Biol Chem**, 1995; 270(19):11703-06.

Bevilacqua, M.P.; Nelson, R.M.; Mannori, G.; Cecconi, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu Rev Med**, 1994; 45:361-78.

Bhat, S.S.; Hegde, S.K.; Habibullah, M.A.; Bernhardt, V. Incipient enamel lesions remineralization using casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate cream with and without fluoride: a laser fluorescence study. **J Clin Pediatr Dent**, 2012; 36(4):353-5.

Bittar, E.E.; Garrod, D.R.; North, A.J.; Chidgey, M.A.J. The adhesive interaction of cells. In: **Advances in molecular and cell biology**: Jai Press Inc, 1999; 28:3-415.

Blomstrand, E.; Eliasson, J.; Karlsson, H.K.R.; Köhnke, R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after exercise. **J Nutr**, 2006; 136(15):269-73.

Bokoch, G.M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, 1995; 86(5):1649-60.

Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **J Exp Med**, 1962; 115(3):453-66.

Brantl, V. Novel opioid peptides derived from β -casein: human β -casomorphins. **Eur J Pharmacol**, 1984; 106:213-14.

Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A.; Lottspeich, F. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. **Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem**, 1979; 360(9):1211-16.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999. **Diretrizes básicas para análise e comprovação de alimentos funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Disponível em: http://www.rebrae.com.br/banco_arquivos/arquivos/nutricao/Manual%20ANVISA.pdf. Acesso em 06/06/2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 233, de 17 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Produção e Controle de Qualidade para Registro, Alteração PósRegistro e Revalidação dos Extratos Alergênicos e dos Produtos Alergênicos**. Disponível em: http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1307385325.pdf. Acesso em 03/03/2013.

Brommage, R.; Juillerat, M.A.; Jost, R. Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal calcium absorption in adult female rats. **Lait**, 1991; 71(2):173-180.

Butcher E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, 1991; 67(6):1033-6.

Butler, N.S.; Harty, J.T. The role of inflammation in the generation and maintenance of memory T cells. **Adv Exp Med Biol**, 2010; 684:42-56.

Byrne, H.M.; Cave, G.; McElwain, D.L. The effect of chemotaxis and chemokinesis on leukocyte locomotion: a new interpretation of experimental results. **IMA J Math Appl Med Biol**, 1998; 15(3):235-56.

Byron, A.; Humphries, J.D.; Humphries, M.J. Defining the extracellular matrix using proteomics. **Int J Exp Pathol**, 2013; 94(2):75-92.

Cánovas, J.M.; Rentero, P.Z.; Martínez, A. M.C; Hernández, M.L.; Aleman, J.A. Péptidos bioactivos. **Clin Invest Arterioscl**, 2011; 23(5):219-227.

Carlos, T.M.; Harlan, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, 1994; 84(7):2068-101.

CEPPA. Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos. **Determinação dos elementos por ICP-OES. PE-LE-032/R04**. Curitiba, 2012; 15 f. (Validação do Método Analítico para Análise de Elementos Químicos na Matriz Água. PE-LE-032. RV-MICP OES-001. Curitiba, 2011 155 f).

Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J.C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jollès, P.; Fiat, A.M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, 1998; 80(2):155-65.

Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M.Y.; Park, S.H.; Kim, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, 2002; 163:1161-8.

Chung, C.Y.; Funamoto, S.; Firtel, R.A. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. **Trends Biochem Sci**, 2001; 26(9):557-66.

Civin, C.I.; Loken, M.R. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. **J Cell Cloning**, 1987; 5(4):267-88.

Clare, D.A; Swaisgood, H.E. Bioactive milk peptides: a prospectus. **J Dairy Sci**, 2000; 83(6):1187-95.

Contreras, M.D.M.; Carrón, R.; Montero, M.J.; Ramos, M.; Recio, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. **Int Dairy J**, 2009; 19(10):566-73.

Contreras, M.D.M.; Sevilla, M.A.; Monroy-Ruiz, J.; Amigo, L.; Gómez-Sala, B.; Molina, E., Ramos, M.; Recio, I. Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. **Int Dairy J**, 2011; 21(7):470-76.

Corradi-Perini, C.; Riella, M.C.; Cattaneo, R.I.; Weffort-Santos, A.M. Association between malnutrition, integrin expression and impaired granulocyte adhesion in chronically hemodialyzed patients. **J Nephrol**, 2010; 23(2):194-201.

Cosentino, S.; Donida, B.M.; Marasco, E.; Favero, E. D.; Cantù, L.; Lombardi, G.; Colombini, A.; Iametti, S., Valaperta, S.; Fiorilli, A.; Tettamanti, G.; Ferraretto, A. Calcium ions enclosed in casein phosphopeptide aggregates are directly involved in the mineral uptake by differentiated HT-29 cells. **Int Dairy J**, 2010; 20(11):770-76.

Costa, N.M.B.; Rosa, C.O.B. **Alimentos Funcionais - componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro, RJ: Rubio, 2010; 9-35.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia, W.B.: Saunders, 1994; 1400 f.

Crisa, L.; Cirulli, V.; Ellisman, M.H.; Ishii, J.K.; Elices, M.J.; Salomon, D.R. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. **J Exp Med**, 1996; 184(1):215-28.

Cross, K.J.; Huq, N.L.; Reynolds, E.C. Casein phosphopeptides in oral health-chemistry and clinical applications. **Curr Pharm Des**, 2007; 13(8):793-800.

Crotti, A.E.M.; Vessecchi, R.; Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, 2006; 29(2):287-92.

Dawn-Linsley, M.; Ekinici, F.J.; Rogers, D.O.E.; Shea, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **J Neurosci Methods**, 2005; 141(2):219-22.

Devreotes, P.N.; Zigmond, S.H. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. **Annu Rev Cell Biol**, 1988; 4:649-86.

Díaz, M.; Decker, E.A. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. **J Agric Food Chem**, 2004; 52(26):8208-13.

Díaz, M.; Dunn, C.M.; McClements, D.J.; Decker, E.A. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. **J Agric Food Chem**, 2003; 51(8):2365-70.

Donida, B.M.; Mrak, E.; Gravaghi, C.; Villa, I.; Cosentino, S.; Zacchi, E.; Perego, S.; Rubinacci, A.; Fiorilli, A.; Tettamanti, G.; Ferraretto, A. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells. **Peptides**, 2009; 30(12):2233-41.

Ellegard, K.H.; Gammelgard-Larsen, C.; Sorensen, E.S.; Fedosov, S. Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. **Int Dairy J**, 1999; 9(9):639-52.

Erba, D.; Ciapellano, S.; Testolin, G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. **Nutr**, 2002; 18(9):743-46.

Etcheverry, P.; Wallingford, J.C.; Miller, D.D.; Glahn, R.P. Calcium, zinc, and iron bioavailabilities from a commercial human milk fortifier: a comparison study. **J Dairy Sci**, 2004; 87(11):3629-37.

Evans, R.; Lellouch, A.C.; Svensson, L.; McDowall, A.; Hogg, N. The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. **Blood**, 2011; 117(12):3331-42.

Farrell, H.M.Jr, Qi, P.X., Brown, E.M., Cooke, P.H., Tunick, M.H., Wickham, E.D.; Unruh, J.J. Molten globule structures in milk proteins: implications for potential new structure-function relationships. **J Dairy Sci**, 2002; 85(3):459-71.

Ferraretto, A.; Signorile, A.; Gravaghi, C.; Fiorilli, A.; Tettamanti, G. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. **J. Nutr**, 2001; 131(6):1655-61.

Ferrazzano, G.F.; Coda, M.; Cantile, T.; Sangianantoni, G.; Ingenito, A. SEM investigation on casein phosphopeptides capability in contrasting cola drinks enamel erosion: an in vitro preliminary study. **Eur J Paediatr Dent**, 2012; 13(4): 285-8, 2012.

Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Quím Nova**, 1999; 22(5):724-31.

Feudale, R.N.; Woody, N.A.; Tan, H.; Myles, A. J.; Brown, S.D.; Ferré, J. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometr Intell Lab**, 2002; 64(2):181-92.

Fitzgerald, R.J; Meisel, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **Brit J Nutr**, 2000; 84(1):33-7.

Fitzgerald, R.J. Potential Uses of Caseinophosphopeptides. **Int Dairy J**, 1998; 8(5-6):451-57.

Gahmberg, C.G.; Valmu, L.; Tian, I.; Kotovuori, P.; Kantor, C.; Hilden, T. Leukocyte adhesion - a fundamental process in leukocyte physiology. **Braz J Med Biol Res**, 1999; 32(5):511-17.

García-Nebot, M.J.; Cilla, A.; Alegría, A.; Barberá, R. Caseinophosphopeptides exert partial and site-specific cytoprotection against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. **Food Chem**, 2011; 129(4):1495-1503.

García-Nebot, M.J.; Alegría, A.; Barberá, R.; Contreras, M.D.M.; Recio, I. Milk versus caseinophosphopeptides added to fruit beverage: resistance and release from simulated gastrointestinal digestion. **Peptides**, 2010; 31(4):555-61.

Garmy-Susini, B.; Avraamides, C.J.; Schmid, M.C.; Foubert, P.; Ellies, L.G.; Barnes, L.; Feral, C.; Papayannopoulou, T.; Lowy, A.; Blair, S.L.; Cheresh, D.; Ginsberg, M.;

Varner, J.A. Integrin $\alpha 4\beta 1$ signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. **Cancer Res**, 2010; 15(70):3042-51.

Gaucheron, F.; Mollé, D.; Léonil, J.; Maubois, J.L. Selective determination of phosphopeptide beta-CN(1-25) in a beta-casein digest by adding iron: characterization by liquid chromatography with on-line electrospray-ionization mass spectrometric detection. **J Chromatogr B Biomed App**, 1995; 664(1):193-200.

Ghosh, S.; Goldin, E.; Gordon, F.H.; Malchow, H.A.; Rask-Madsen, J.; Rutgeerts, P.; Vyhnašek, P.; Zádorová, Z.; Palmer, T. Donoghue, S. Natalizumab for active Crohn's Disease. **New Engl J Med**, 2003; 348(1):24-32.

Gismondi, A.; Morrone, S.; Humphries, M.J.; Piccoli, M.; Frati, L.; Santoni, A. Human natural killer cells express VLA-4 and VLA-5, which mediate their adhesion to fibronectin. **J Immunol**, 1991; 46(1):384-92.

Goody, R.J.; Kitchen, I. Influence of maternal milk on functional activation of δ -opioid receptors in postnatal rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 2001; 296(3):744-48.

Golias, C.; Tsoutsis, E.; Matziridis, A.; Makridis, P.; Batistatou, A.; Charalabopoulos, K. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. **In Vivo**, 2007, 21(5):757-69.

Gomes, M.A.M.; Neto, N.C.M.; Bispo, I.G.A. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. **Rev SOCERJ**, 2009; 22(6):398-403.

Gravaghi, C.; Favero, E.D.; Cantu, L.; Donetti, E.; Bedoni, M.; Fiorilli, A.; Tettamani, G.; Ferraretto, A. Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells - relationship between biological activity and supramolecular structure. **FEBS J**, 2007; 274(19):4999-5011.

Greig, F.H.; Kennedy, S.; Spickett, C.M. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. **Free Radic Biol Med**, 2012; 52(2):266-80.

Grote, K.; Schütt, H.; Schieffer, B. Toll-Like receptors in angiogenesis. **ScientificWorldJournal**, 2011; 11:981-91.

Hansen, M.; Sandström, B.; Lönnerdal, B. The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. **Pediatr Res**, 1996;40:547-52.

Hartmann, R.; Meisel, H. Caseinophosphopeptides and their cell modulating potential. **BioFactors**, 2004; 21(1-4):73-78.

Hartmann, R.; Meisel, H. Cytochemical assessment of phosphopeptides derived from casein as potential ingredients for functional food. **Nahrung**, 2002; 46(6):427-31.

Hartmann, R.; Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Curr Opin Biotechnol**, 2007; 18(2):163-9.

Hasler, C.M. Functional Foods: benefits, concerns and challenges - a position paper from the American Council on Science and Health. **J Nutr**, 2002; 132(12):3772-81.

Heinrikson, R.L.; Meredith, S.C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. **Anal Biochem**, 1984; 74(136):65-74.

Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**; 1999; 207: 604-611.

Hoek, K.S.; Milne, J.M.; Grieve, P.A.; Dionysius, D.A.; Smith, R. Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. **Antimicrob Agents Chemother**, 1997; 41(1):54-59.

Holt, C.; Wahlgren, N.M.; Drakenberg, T. Ability of a beta-casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters. **Biochem. J**, 1996; 315(Pt 3):1035-39.

Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**; 1992; 69(1):11-25.

Hyun, Y.M.; Chung, H.L; McGrath, J.L.; Waugh, R.E.; Kim, M. Activated integrin VLA-4 localizes to the lamellipodia and mediates T cell migration on VCAM-1. **J Immunol**, 2009; 183(1):359-69.

Jayaprakasha, G.K; Singh, R.P; Sakariah. K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chem**, 2001; 73(3):285-90.

Jaziri, M.; Migliore-Samour, D.; Casabianca-Pignède, M.R.; Keddad, K.; Morgat, J.L.; Jollès, P. Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1992; 1160(3):251-61.

Jin, T.; Hereld, D. Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. **Eur J Cell Biol**, 2006; 85(9-10):905-13.

Jinushi, M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. **Oncoimmunology**, 2012; 1(2):189-94.

Kanekanian, A.D.; Williams, R.J.H.; Brownsell, V.L; Andrews, A.T. Caseinophosphopeptides and dental protection: concentration and pH studies. **Food Chem**, 2008; 107(3):1015-21.

Katagiri, T.; Adachi, I.; Terao, T.; Osawa, T. Alpha-casein-binding proteins of guinea pig macrophage membranes and their possible roles in chemotaxis. **J. Biochem**, 1980; 87(5): 1421-30.

Kato, M.; Kimura, H.; Motegi, Y.; Tachibana, A.; Minakami, H.; Morikawa, A.; Kita, H. Platelet-activating factor activates two distinct effector pathways in human eosinophils. **J Immunol**, 2002; 169(9):5252-9.

Kawahara, T.; Otani, H. Stimulatory effects of casein phosphopeptide (CPP-III) on mRNA expression of cytokines in Caco-2 Cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2004; 68(8):1779-81.

Keller, H.U., Wilkinson, P.C., Abercrombie, M.; Becker, E.L.; Hirsch, J.G.; Miller, M.e.; Ramsey, W.S.; Sigmond, S.H. (1977) A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocytes and other cells. **J Immunol**, 1977; 118(5):1912-4.

Kibangou, I.B.; Bouhallab, S.; Henry, G.; Bureau, F.; Allouche, S.; Blais, A.; Guérin, P.; Arhan, P.; Bouglé, D.L. Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. **Pediatr Res**, 2005; 58(4):731-4.

Kim, G.N.; Jang, H.D.; Kim, C.i. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. **Food Chemistry**, 2007; 104(4):1359-65.

Kim, H.D.; Peyton, S.R. Bio-inspired materials for parsing matrix physicochemical control of cell migration: a review. **Integr Biol (Camb)**, 2011; 4(1):37-52.

Kitazawa, H.; Yonezawa, K.; Tohno, M.. Shimosato, T.; Kawai, Y, Saito, T.; Wang, J.M. Enzymatic digestion of the milk protein beta-casein releases potent chemotactic peptide(s) for monocytes and macrophages. **Int Immunopharmacol**, 2007; 7(9):1150-59.

Kitts, D.D.; Yuan, Y,V. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. **Trends Food Sci Technol**, 1992; 3:31-35.

Kitts, D.D. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. **Trends Food Sci Tech**, 2005; 16(12):549-54.

Kitts, D. D.; Nakamura, S. Calcium enriched casein phosphopeptide stimulates release of IL-6 cytokine in human epithelial intestinal cell line. **J Dairy Res**, 2006; 73(1):44-48.

Koh, T.J.; Dipietro, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev Mol Med**, 2011; 23:13-23.

Korhonen, H.; Pihlanto, A. Bioactive peptides: production and functionality. **Int Dairy J**, 2006; 16(9):945-60.

Krüger, C.C.H. **Produção e caracterização química e fisiológica de caseinofosfopeptídeos de leite bovino**. 138 f. Tese (doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

Krüger, C.C.H.; Cândido, L.M.B. Caseinofosfopeptídeos: obtenção e atividade biológica. **Alim. Nutr**, 2009; 20(1):167-73.

Krüger, C.C.H.; Silva, C.A.; Vedana, M.I.S.; Tiene, C.; Cândido, L.M.B. Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina. **Alim. Nutr.**, 2006; 1(1):7-12.

Kunkel, E.J.; Ley, K. Distinct phenotype of E-selectin - deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. **Circ Res**, 1996; 79(6):1196-204.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227(5259):680-5.

Laffón, A.; Garcia-Vicuña, R.; Humbría, A.; Postigo, A.A.; Corbí, A.L.; Landázuri, M.O.; Sánchez-Madrid, F. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors human activated T cells in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, 1991; 88(2):546-52.

Laguette, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Prog Lipid Res**, 2007; 46(5):244-82.

Lampugnani, M.G.; Dejana, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. **Curr Opin Cell Biol**, 1997; 9(5):674-82.

Larson, R.S.; Hibbs, M.L.; Springer, T.A. The leukocyte integrin LFA-1 reconstituted by cDNA transfection in a nonhematopoietic cell line is functionally active and not transiently regulated. **Cell Regul**, 1990; 1(4):359-67.

Lemoine, F.M.; Dedhar, S.; Lima, G.M.; Eaves, C.J. Transformation-associated alterations in interactions between pre-B cells and fibronectin. **Blood**, v. 76, n. 11, p. 2311-20, 1 dez 1990.

Léonil, J.; Gagnaire, V.; Mollé, D.; Pezenec, S.; Bouhallab, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. **J Chromatogr A**, 2000; 881(1-2):1-21.

Lewis, S.L., Van Epps, D.E. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. **Inflammation**, 1983; 7(4):363-75.

Ley, K. **Inflammation: The leucocyte adhesion cascade**. Disponível em: <<http://bme.virginia.edu/ley/>>. Acesso em: 15/12/2011.

Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Mol Med**, 2003; 9(6):263-68.

Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, 2007; 7(9):678-89.

Li, R.; Maminishkis, A.; Zahn, G.; Vossmeier, D.; Miller, S.S. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ mediates attachment, migration, and proliferation in human perinatal pigment epithelium: relevance for proliferative retinal disease. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2009; 50(12):5988-96.

Lingen, M.W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch Pathol Lab Med**, 2001; 125(1):67-71.

Llena, C.; Forner, L.; Baca, P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. **J Contemp Dent Pract**, 2009; 10(3):1-9.

López-Expósito, I.; Amigo, L.; Recio, I. Identification of the initial binding sites of alphas2-casein f(183-207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. **Biochim Biophys Acta**, 2008; 1778(10):2444-9.

López-Hoyos, M.; Revilladagger, C.; Conde, C.; Del Campo, E.G.; González, A.; Merino, J. Different roles for LFA-1 and VLA-4 integrins in T-B-cell interactions in vivo. **Immunology**, 1999; 97(3): 438-46.

Luo, B.H; Carman, C.V; Springer, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev Immunol**, 2007; 25:619-47.

Maître, J.L.; Heisenberg, C.P. The role of adhesion energy in controlling cell-cell contacts. **Curr Opin Cell Biol**, 2011; 23(5):508-14.

Massotte, D., Brillet, K, Kieffer, B.; Milligan, G. (2002) Agonists activate $G_{i1\alpha}$ or $G_{i2\alpha}$ fused to the human mu opioid receptor differently. **J Neurochem**, 2002; 81(6):1372-82.

McCann, K.B.; Shiell, B.J.; Michalski, W.P.; Lee, A.; Wan, J.; Roginski, H.; Coventry, M.J. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. **Int Dairy J**, 2006; 16(4):316-23.

Meisel, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. **Biopoly**, 1997; 43(2):119-28.

Meisel, H; Bernard, H.; Fairweather-Tait, S.; FitzGerald, R.J.; Lane, C.N.; McDonagh, D.; Techuer, B.; Wal, J.M. Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. **Br J Nutr**, 2003; 89(3):351-9.

Meisel, H; Bockelmann, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, 1999; 76(1-4):207-15.

Meisel, H; Fitzgerald, R.J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Curr Pharm Des**, 2003; 9(16):1289-95.

Meisel, H; Frister, H.; Sehlimme, E. Biologically active peptides in milk proteins. **Z Ernährungswiss**, 1989; 28(4):267-78.

Meisel, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. **Livest Prod Sci**, 1997; 50(1-2):125-138.

Mendonça, R.J.; Coutinho-Netto, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, 2009; 84(3):257-62.

Merchant, D.; Kahn, R.; Murphy, W. **Handbook of cell and organ culture**. Burgess Publishing, Broken Arrow, 1964.

Mills, S.; Ross, R.P.; Hill, C.; FitzGerald, G.F.; Stanton, C. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. **Int Dairy J**, 2011; 21(6):377-401.

Minervini, F.; Algaron, F.; Rizzello, C.G.; Fox, P.F.; Monnet, V.; Gobetti, M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from lactobacillus helveticus PR4 proteínase-hydrolyzed caseins of milk from six species. **Appl Environ Microbiol**, 2003; 69(9):5297–5305.

Miquel, E.; Gomez, J.A.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Récio, I. Identification of casein phosphopeptides in β -casein and commercial hydrolysed casein by mass spectrometry. **Food Sci Technol Int**, 2006; 12(5):379-84.

Miquel, E.; Gómez, J.Á.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Recio, I. Identification of casein phosphopeptides released after simulated digestion of milk-based infant formulas. **J Agric Food Chem**, 2005; 53:3426-3433.

Miranda, G.; Mahé, M.F.; Leroux, C.; Martin, P. Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk. **Proteomics**, 2004; 4(8):2496-509.

Mora-Gutierrez, A.; Farrell, H.M.; Attaie, R.; McWhinney, V.J.; Wang, C. Influence of bovine and caprine casein phosphopeptides differing in alphas1-casein content in determining the absorption of calcium from bovine and caprine calcium-fortified milks in rats. **J Dairy Res**, 2007; 74(3):356-66.

Morais, H.A.; Barbosa, C.M.S.; Lopes, D.C.F.; Oliveira, M.C.; Silvestre, M. A.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. **ALAN**, 2002; 52(1):77-83.

Morais, S.M.; Júnior, F.E.A.C; Silva, A.R.A.; Neto, J.S.M.; Rondina, D.; Cardoso, J. H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Quim Nova**, 2006; 29(5):907-10.

Muth, C.A.; Steinl, C.; Klein, G.; Lee-Thedieck, C. Regulation of hematopoietic stem cell behavior by the nanostructured presentation of extracellular matrix components. **PLoS One**, 2013; 8(2):e54778.

Nagae, M.; Re, S.; Mihara, E.; Nogi, T.; Sugita, Y.; Takagi, L. Crystal structure of $\alpha 5 \beta 1$ integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. **J Cell Biol**, 2012; 197(1):131-40.

Nardin, J.M.; Souza, W.M.; Lopes, J.F.; Florão, A.; de Moraes Santos, C.A.; Weffort-Santos, A.M. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. **Planta Med**, 2008; 74(10):1253-8.

Nongonierma, A.B.; FitzGerald, R.J. Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. **Caries Res**, 2012; 46(3):234-67.

NOVOZYMES. **Pancreatic Trypsin Novo**. Special Food/2001-07050-03, 2003

Odell, E.W.; Sarra, R.; Foxworthy, M.; Chapple, D.S.; Evans, R.W. Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. **FEBS Lett**, 1996; 382(1-2):175-8.

Otani, H.; Kitamura, H.; Park, M.; Kihara, Y.; Oshida, T.; Kusuhara, S.; Sawada, K. Enhancement of intestinal IgA levels in piglets by oral administration of a commercially available casein phosphopeptide preparation. **Milchwissenschaft**, 2000; 55(8): 429-432.

Otani, H.; Nakano, K.; Kawahara, T. Stimulatory effect of a dietary casein phosphopeptide preparation on the mucosal IgA response of mice to orally ingested lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2003; 67(4):729-35.

Pereira, A.L.A.; Veras, S.S.L.; Silveira, E.J.D.; Seabra, F.R.G.; Pinto, L.P.; Souza, L.B.; Freitas, R.A. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínas em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, 2005; 71(1):81-86.

Phadungath, C. Casein micelle structure: a concise review. **Songklanakarin J Sci Technol**, 2005; 27(1):201-212.

Phelan, M.; Aherne, A.; FitzGerald, R.J.; O'Brien, N.M. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **Int Dairy J**, 2009a; 19(11):643-54.

Phelan, M.; Ahern-Bruce, S.A.; O'Sullivan, D.; FitzGerald, R.J.; O'Brien, N.M. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. **Int Dairy J**, 2009b; 19(5):279-285.

Phelan, M., Aherne, A.; O'Sullivan, D.; FitzGerald, R.J.; O'Brien, N.M. Growth inhibitory effects of casein hydrolysates on human cancer cell lines. **J Dairy Res**, 2010; 77(2):176-82.

Pihlanto-Leppälä, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends Food Sci Tech**, 2001; 11(9-10):347-56.

Pointillart A, Guéguen, L. Absence of effect of the incorporation of a milk phosphopeptide on the utilization of calcium and phosphorus in the young pig. **Reprod Nutr Dev**, 1989; 29(4):477-86.

Power, O.; Jakeman, P.; FitzGerald, R.J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, 2013; 44(3):797-820.

Presibella, M.M.; Santos, C.A.M.; Weffort-Santos, A.M. In Vitro Antichemotactic Activity of Chamomilla recutita Hydroethanol Extract. **Pharmaceutical Biology**, 2007; 45:1–7.

Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, 1999; 269:337–41.

Reynolds, E.C.; Riley, P.F.; Adamson, N.J. A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification. **Anal Biochem**, 1994; 217(2):277-84.

Rigby, K.M.; DeLeo, F.R. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. **Semin Immunopathol**, 2012; 34(2):237-59.

Rogero, M.M.; Tirapegui, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Rev Bras Cienc Farm**, 2008; 44(4):563-75.

Rossini, K. **Avaliação de hidrolisados de caseína como antioxidantes em produtos cárneos e chocolate branco**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

Sakanaka, S.; Tachibana, Y.; Ishihara, N.; Juneja, L.R. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. **J Agric Food Chem**, 2005; 53(2):464-8.

Sandré, C.; Gleizes, A.; Forestier, F.; Georges-Kergot, R.; Chilmonczyk, S.; Léonil, J.; Moreaus, M.C.; Labarre, C. A peptide derived from bovine beta-casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. **J. Nutr**, 2001, 131(11):2936-42.

Sarmadi, B.H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, 2010; 31(10):1949-56.

Schaafsma, G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. **Eur J Clin Nutr**, 2009; 63(10):1161-8.

Schall, T.J. The chemocines. In **The Cytokine Handbook** (ed. A. Thompson), Academic Press, London. 1994; 419-60.

Scholz-Ahrens, K.E.; Kopra, N.; Barth, C.A. Effect of casein phosphopeptides on utilization of calcium in minipigs and vitamin-D-deficient rats. **Z Ernährungswiss**, 1980; 29(4):295-298.

Scholz-Ahrens, K.E.; Schrezenmeir, J. Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. **Br J Nutr**, 2000; 84(suppl1):147-53.

Sgarbieri, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Braz J Food Technol**, 2005; 8(1):43-56.

Sharp, J.S.; Becker, J.M.; Hettich, R.L. Analysis of protein solvent accessible surfaces by photochemical oxidation and mass spectrometry. **Anal Chem**, 2003; 76(3):772-83.

Silva, M.R.; Rodrigues, D.F.; Lana, F.C.; Silva, V.D.M.; Harriman, A.; Pinto, M. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina e da papaína. **J Brazilian Soc Food Nutr**, 2010; 35(3):97-114.

Snyderman, R.; Goetzl, E.J. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. **Science**, 1981; 213(4510):830-7.

Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, 1994;76(2):301-14.

Stuknyte, M.; Noni, I.; Guglielmetti, S.; Minuzzo, M.; Mora, D. Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteínases of lactic acid bacteria. **Int Dairy J**, 2011; 21(10):763-69.

Sun, W.Y.; Pitson, S.M.; Bonder, C.S. Tumor necrosis factor-induced neutrophil adhesion occurs via sphingosine kinase-1-dependent activation of endothelial $\alpha_5\beta_1$ integrin. **Am J Pathol**, 2010; 177(1):436-46.

Szabo, I., Chen, X.-H.; Xin, L.; Adler, M.W.; Howard, O.M.Z.; Oppenheim, J.J.; Rogers, T.J. Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2002; 99(16):10276-81.

Szeberényi, J.B.; Rothe, G.; Pállinger, E.; Orsó, E.; Falus, A.; Schmitz, G. Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood. **Immunobiology**, 2000; 202(1): 51-8.

Takagi, J.; Strokovich, K.; Springer, T.A.; Walz, T. Structure of integrin $\alpha_5\beta_1$ in complex with fibronectin. **EMBO J**, 2003; 22(18):4607-15.

Tanaka, Y. The role of chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Drugs Today**, 2001; 37(7):477-84.

Tauzin, J.; Miclo, L.; Roth, S.; Mollé, D.; Gaillard, J.-L. Tryptic hydrolysis of bovine α_{S2} -casein: identification and release kinetics of peptides. **Int Dairy J**, 2003; 13:15-27.

Teschemacher, H., Koch, G.; Brantl, V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. **Biopoly**, 1997; 43(2):99-117.

Teucher, B.; Majsak-Newman, G.; Dainty, J.R.; McDonagh, D.; FitzGerald, R.J.; Fairweather-Tait, S.J. Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. **Am J Clin Nutr**, 2006; 84(7):162-66.

Theveneau, E.; Marchant, L.; Kuriyama, S.; Gull, M.; Moepps, B.; Parsons, M.; Mayor, R. Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. **Dev Cell**, 2010; 19(1):39-53.

Tomé, D.; Debabbi, H. Physiological effects of milk protein components. **Clin Nutr**, 1998, 8(5-6):383-92.

Tsuchita, H.; Goto, T.; Shimizu, T.; Yonehara, Y.; Kuwata, T. Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. **J Nutr**, 1996; 126(1):86-93.

Tulipano, G.; Bulgari, O.; Chessa, S.; Nardone, A.; Cochi, D.; Caroli, A. Direct effects of casein phosphopeptides on growth and differentiation of in vitro cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1). **Regul Pept**, 2010; 160(1-3):168-74.

Turk, J.L. Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds". **Int J Exp Path**, 1994; 75(6):385-95.

Valerio, A.; D'Antona, G.; Nisoli, E. Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: an evolutionary perspective. **Aging**, 2011; 3(5):464-78.

van der Flier, A.; Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res**, 2001; 305(3):285-98.

Veisseyre, R. **Lactología técnica**. Zaragoza, España: Acribia, 1988.

Vessecchi, R.; Galembeck, S.E.; Lopes, N.P.; Nascimento, P.G.B.D.; Crotti, A.E.M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Quim Nova**, 2008; 31(4):840-53.

Voltarelli, J.C. Febre e inflamação. **Medicina (Ribeirão Preto)**, 1994; 27(1/2):7-48.

Wang, W.; Mejia, E.G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Compr Rev Food Sci F**, 2005; 4(4):63-78.

Wilkie, T.M.; Scherle, P.A.; Strathmann, M.P.; Slepak, V.Z.; Simon, M.I. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1991; 88(22):10049-53.

Wilkinson, P.C. Leukocyte locomotion and chemotaxis: effects of bacteria and viruses. **Rev Infect Dis**, 1980; 2(2):293-318.

Wilkinson, P.C. Cell Locomotion and Chemotaxis: Basic Concepts and Methodological Approaches. **Methods: A companion to Methods in Enzymology**, v. 10, p. 74-81, 1996.

Wilkinson, P.C. Chemotaxis. **Encyclopedia of Immunology**, 1998;533-37.

Wilkinson, P.C.; Haston, W.S. Chemotaxis: an overview. **Meth Enzymol**, 1988; 162:3-16.

ANEXO



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 16 de dezembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Thais Regina Mezzomo
Almeriane Maria Weffort Santos
Claudia Carneiro Hecke Krüeger

Nesta

Prezadas Pesquisadoras,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Atividade anti-inflamatória de caseinofosfopeptídeos**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 23 de novembro de 2011 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 16 de dezembro de 2011.

Registro **CEP/SD**: 1265.190.11.11

CAAE: 0188.0.091.000-11

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial e/ou de conclusão: 18/06/2012.

Atenciosamente

Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado(a) a participar de forma voluntária do projeto de pesquisa intitulado "*Atividade Anti-inflamatória de Caseinofosfopeptídeos*", coordenado por uma nutricionista, agora denominada pesquisadora. É através de pesquisas experimentais que ocorrem avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
- b) Este estudo tem como finalidade investigar os efeitos de moléculas de proteínas denominadas caseinofosfopeptídeos, que serão obtidas do leite bovino, sobre as funções dos leucócitos obtidos do sangue periférico em ensaios que serão realizados em um laboratório de pesquisa.
- c) Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entenda. Por favor, peça à responsável pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.
- d) Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento. A sua participação envolve a doação de cerca de 20 mililitros de sangue, o qual será colhido de uma de suas veias da dobra do cotovelo por profissional competente.
- e) A quantidade de sangue por você doada será destinada à separação dos leucócitos para serem usados nos ensaios do projeto. Pela doação você poderá sentir algum desconforto, porém passageiro, no local da coleta. Também, após a mesma, manchas roxas poderão eventualmente aparecer, mas serão indolores e desaparecerão naturalmente após alguns dias.
- f) Caso você concorde em participar, não deverá estar fazendo uso de medicamentos nos últimos dez dias, porque alguns medicamentos podem interferir com os leucócitos e tornar o experimento incorreto.

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 16 / 12 / 11

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- g) Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo e você não será remunerado por sua participação. Todas as despesas necessárias para a realização deste estudo serão de responsabilidade do investigador e sua equipe.
- h) Os benefícios desse estudo se referem à melhoria nas formulações alimentares que usam derivados do leite bovino.
- i) Se você precisar, poderá contatar a qualquer momento o investigador do estudo ou sua equipe nos seguintes telefones: Nutricionista Thais Regina Mezzomo, fones 3085-8065, 3360-4087 ou (46)9971-5032, ou Prof^a Almeriane Maria Weffort Santos, fones 3360-4087 ou 9166-8368.
- j) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do sujeito de pesquisa
Local e data

Identificação do Responsável

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 16 / 12 / 11