



Qualidade físico-química e atividades biológicas de caseinofosfopeptídeos obtidos por hidrólise triptica de caseinato de sódio sob diferentes condições

Thais Regina Mezzomo¹; Cleverson Antonio Ferreira Martins²; Marcelo Ribani³; Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth⁴; Claudia Carneiro Hecke Krüger⁵; Almeriane Maria Weffort-Santos^{6*}

¹Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional. Universidade Federal do Paraná. Av. Lothário Meissner, 632 - 80210-170 – Curitiba - PR – Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR – Brasil.

³Instituto de Tecnologia do Paraná, TECPAR. Laboratório de Química Fina. Curitiba - PR – Brasil.

⁴Departamento de Análises Clínicas. Laboratório de Bacteriologia Clínica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR – Brasil.

⁵Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional. Departamento de Nutrição. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR – Brasil.

⁶Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional. Departamento de Patologia Médica. Laboratório de Hematologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR – Brasil.

RESUMO

Muitos métodos têm sido empregados na produção de peptídeos bioativos para a promoção da saúde. O objetivo deste estudo foi produzir caseinofosfopeptídeos por hidrólise triptica do caseinato de sódio usando diferentes temperaturas (37 e 50 °C) e tempos de reação (2 e 4 h), caracterizá-los e analisar sua influência nas atividades citotóxica, antimicrobiana e antioxidante. Caseinofosfopeptídeos foram caracterizados através da composição centesimal, eletroforese em gel de poliácridamida, Espectrometria de Massas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Toxicidade para leucócitos humanos, atividade antimicrobiana utilizando o teste de microdiluição em caldo e determinação da capacidade antioxidante pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram os ensaios biológicos realizados. Os resultados mostraram que as quatro frações peptídicas obtidas apresentaram-se com baixo peso molecular e elevados teores proteico e mineral; quanto ao perfil aminoacídico, apresentaram elevadas e diferenciadas quantidades de ácido glutâmico e serina, que pouco variaram de acordo com o processo de obtenção; não se mostraram tóxicos para leucócitos humanos; demonstraram atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis* e elevada capacidade antioxidante. Os resultados físico-químicos das frações de caseinofosfopeptídeos demonstraram elevada composição nutricional em termos de proteína e, principalmente, cálcio. O conjunto de dados indicou que alterações no tempo e na temperatura de reação para a obtenção dos hidrolisados não interferem nas suas qualidades biológicas, mostrando serem seguros para a promoção da saúde e para a aplicação em situações especiais, que envolvem pacientes desnutridos, imunossuprimidos, com comprometimento ósseo ou gastrointestinal decorrentes de inflamações e infecções.

PALAVRAS-CHAVE: Caseinofosfopeptídeos. Caseinato de sódio. Citotoxicidade. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante.

Autor correspondente: Almeriane Maria Weffort-Santos, Departamento de Patologia Médica. Laboratório de Hematologia. Universidade Federal do Paraná. Av. Lothário Meissner, 632 - 80210-170 – Curitiba - PR – Brasil. almeriane@ufpr.br

INTRODUÇÃO

Após o consumo de leite, leites fermentados, iogurtes, queijos ou da própria caseína, a fração proteica mais abundante desses alimentos, fragmentos peptídicos são produzidos naturalmente através da ação combinada de enzimas gástricas e pancreáticas (Phelan *et al.*, 2009).

Apesar da variação no comprimento, na composição e na sequência de aminoácidos, esses fragmentos peptídicos são dotados de atividade biológica variada, com capacidade de modular funções fisiológicas específicas no organismo humano, tanto no trato gastrointestinal como de forma sistêmica (Mills *et al.*, 2011; Urista *et al.*, 2011; Hartmann & Meise, 2007). Nesse sentido, observa-se seu uso na produção de alimentos especiais para diversos grupos populacionais, com finalidades terapêuticas relacionadas à manutenção do estado nutricional, como recém-nascidos prematuros, crianças e adultos com dificuldades de absorção e com alergia a proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade. Também se tem observado efeitos benéficos dos hidrolisados da caseína na suplementação alimentar de idosos, em nutrição enteral, na nutrição desportiva e em dietas para o controle de peso (Mills *et al.*, 2011; Urista *et al.*, 2011; Hartmann & Meise, 2007).

A caseína bovina é uma das mais importantes fontes desses peptídeos e sua hidrólise pode também ser realizada *in vitro* por meio de enzimas microbianas, animais e vegetais ou, ainda, por fermentação de bactérias ácido-lácticas, liberando fragmentos com grande variação em termos de peso molecular (Phelan *et al.*, 2009).

Dentre os hidrolisados da caseína obtidos *in vitro* estão os caseinofosfopeptídeos (CPP), caracterizados como fragmentos ricos em serina e fósforo, onde estudos têm demonstrado que, além das atividades antimicrobiana (Krüger & Cândido, 2007), imunoestimulante e antitrombótica (Fiat *et al.*, 1993), podem ser utilizados como coadjuvantes no tratamento de doenças ósseas, como a osteopenia e a osteoporose (Hartmann & Meise,

2007; Kitts & Yuan, 1992), no aumento da absorção de minerais, especialmente cálcio, zinco e ferro, como remineralizantes dentais (Nongonierma & Fitzgerald, 2012), retardando o aparecimento de cáries (Llena *et al.*, 2009). Mais recentemente, observou-se que fragmentos peptídicos originados das proteínas do leite podem atuar sistemicamente, protegendo as células contra danos oxidativos (Power *et al.*, 2013) pela habilidade de sequestrar radicais livres, e como anti-hipertensivos, atuando na regulação da pressão sanguínea como inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (Cánovas *et al.*, 2011).

De forma semelhante ao que ocorre *in vivo*, o processo de produção de CPP por hidrólise utilizando uma ou mais enzimas, sob condições controladas, resulta em uma coleção de fragmentos de tamanho variado, os quais dependem da enzima utilizada, do pH, do tempo e da temperatura de reação, dentre outras variáveis, influenciando diretamente sua funcionalidade (Phelan *et al.*, 2009; Urista *et al.*, 2011; Meisel *et al.*, 2003; Korhonen & Pihlanto, 2006).

Entretanto, observa-se na literatura o emprego de vários métodos de hidrólise enzimática na obtenção de CPP. Com tantos parâmetros influenciando este tipo de reação, fica claro que a obtenção de fragmentos de tamanhos regulares cuja funcionalidade biológica deve ser preservada pode ser prejudicada pelas dificuldades em se reproduzir as metodologias descritas.

Dessa forma, foi objetivo desse estudo demonstrar que o conjunto de CPP obtidos por hidrólise controlada do caseinato de sódio quando diferenças grandes na temperatura (37 e 50 °C) e no tempo de reação (2 e 4 horas) são empregadas têm algumas de suas funções biológicas mais conhecidas, como as atividades antimicrobiana e antioxidante, por exemplo, preservadas, podendo ser úteis na formulação de alimentos funcionais que já se mostraram importantes para regular processos orgânicos, contribuindo assim, não só para com a promoção da saúde, mas oferecendo maior proteção à saúde de portadores de condições crônicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Como matéria-prima, utilizou-se caseinato de sódio LACTONAT HV, gentilmente cedida pela Lactoprot (Alemanha). A enzima utilizada foi a *Pancreatic Trypsin Novo* – PTN 6.0, cedida pela empresa Novozymes (Dinamarca). Os reagentes de grau analítico utilizados foram de origem Merck e Sigma-Aldrich.

Obtenção de CPP

Os peptídeos foram produzidos por hidrólise triptica do caseinato de sódio, seguida de precipitação ácida, agregação mineral e precipitação com etanol (Adamson & Reynolds, 1995) com algumas modificações envolvendo o tempo e a temperatura de reação, como descrito a seguir. Dissolveram-se 228,57 g de caseinato de sódio bovino em 2L de água deionizada para produzir, aproximadamente,

uma solução a 10% de proteínas (p/v). O pH inicial de 6,38 da solução foi ajustado para 8 e tripsina (PTN 6.0), na proporção E/S 1:100, dissolvida em água, foi adicionada. Aliquotas iguais foram, então, sujeitas à hidrólise por 2 e 4 horas, sob leve e constante agitação, a 37 e 50 °C. O pH 8,0 foi mantido durante todo o procedimento. Após hidrólise, reduziu-se o pH para 4,64 com HCl 2 mol/L e o precipitado insolúvel obtido foi removido por centrifugação (3.000g/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 coletado por centrifugação (4.000 g/15 min) foi dissolvido em água, congelado a menos 80 °C, submetido à liofilização e, em seguida, mantido congelado a menos 25 °C até o momento de uso.

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 (Horwitz, 1990). O teor de cinzas foi determinado pelo método de incineração em mufla a 550 °C até peso constante¹⁵. A umidade foi mensurada pelo meio de secagem em estufa com circulação de ar forçada à 105 °C até peso constante (Horwitz, 1990). Os teores de cálcio, fósforo e sódio foram determinados por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (CEPPA, 2012).

Caracterização dos CPP por eletroforese em gel de poli(acrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio) (SDS-PAGE)

Análise dos hidrolisados foi realizada por meio de corrida eletroforética em gel de poli(acrilamida a 20% em condições desnaturantes (Laemmli, 1970), juntamente com soroalbumina bovina (BSA), caseinato de sódio e caseína bovina. Como marcador de peso molecular (M), utilizou-se o Broad Range Markers sc-2361 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após a corrida, as bandas proteicas foram registradas com câmera fotográfica digital Canon Power Shot ELPH 110 HS.

Caracterização de CPP por análise em infusão direta em espectrômetro de massas

Instrumentação e condições de análise

Os experimentos foram conduzidos em um espectrômetro de massas (EM) do tipo triplo quadrupolo, modelo API 3200 (Applied Biosystems) equipado com bomba seringa modelo Harvard 22 Dual (Harvard Apparatus) e 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, à vazão de 10 µL/min. Os parâmetros usados foram: 4 kV de voltagem do capilar; 10 eV de potencial de entrada no cone EP; 40 eV de potencial de desagrupamento; gás de Interface (CUR): 10 psi; gás de nebulização (GS1): 15 psi e temperatura de 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, com varredura entre 100 a 1800 Daltons, acumulando 100 ciclos de 3 segundos. A aquisição dos dados foi obtida com o Programa *Analyst* 1.4 (ABI/Sciex).

Preparo das amostras

Foram preparadas soluções a 0,2% dos CPP liofilizados em água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (Miquel *et al.*, 2006). As amostras foram homogeneizadas, filtradas (0,45 μm de diâmetro) e imediatamente submetidas aos experimentos de DIMS, sendo cada análise realizada em triplicata. Os espectros de massas de água contendo 0,1% de TFA foram considerados como branco e subtraídos dos resultados obtidos com as soluções de CPP.

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

Instrumentação e condições de análise

O sistema cromatográfico analítico utilizado foi um cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom, composto por 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), mantida à 35 °C. Os CPP foram eluídos com os eluentes A (tampão acetato pH 6,4 e acetonitrila na proporção 94:6 (v/v), e B (acetonitrila:água a 60:40 v/v).

Hidrólise ácida dos CPP

De acordo com a metodologia de Heinrikson & Meredith (1984), 20 μL da solução aquosa a 1% de cada amostra de CPP secos em aparelho Pico Tag® foram submetidos à hidrólise por 24 horas a 105 °C sob vácuo, em presença de vapores de N_2 e HCl 6 mol/L com 1% de fenol. Em seguida, foram adicionados 10 μL de solução de resecagem (etanol:água:trietilamina 2:2:1, v/v) nas amostras para eliminação de resíduos ácidos. Após nova secagem procedeu-se a derivatização adicionando-se 20 μL do reagente PITC (etanol:trietilamina:água:fenil-isotiocianato 7:1:1:1, v/v) recentemente preparado e deixado em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente.

Análise e quantificação de aminoácidos

A separação dos aminoácidos foi realizada por CLAE utilizando-se coluna de fase reversa C18 e monitoração em 254 nm após solubilização dos produtos de hidrólise dos CPP secos terem sido dissolvidos em 200 μL de solução composta por tampão fosfato de sódio pH 7,4 e acetonitrila (95:5-v/v). A solução comercial Pierce®, a qual contém concentração conhecida de vários aminoácidos,

foi submetida ao mesmo procedimento experimental e usada como referência para a estimativa da concentração dos aminoácidos presentes nas amostras em estudo, a qual baseou-se no tempo de retenção e na área do pico obtidos para cada aminoácido.

Obtenção de leucócitos humanos

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos saudáveis, maiores de 20 anos, de ambos os sexos e sem uso de medicação nos últimos 10 dias, os quais doaram 20 mL de sangue obtidos por punção venosa, que foram acondicionados em frascos estéreis contendo heparina sódica. O procedimento de coleta foi realizado após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, sob Protocolo CEP/SD no 1265.190.11.11.

Separação de granulócitos humanos

Polimorfonucleares (PMN - neutrófilos, eosinófilos e basófilos) foram obtidos por meio de centrifugação em condições de esterilidade, usando-se o gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS 1.077 g/cm³ (Amersham, Biosciences), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, após centrifugação do sangue a 400 g por 30 min, os PMN foram recuperados do sedimento após lise dos eritrócitos com solução hemolisante (NH_4Cl 8,02 g/L; NaHCO_3 0,84 g/L; EDTA 0,7 g/L). Após dupla lavagem em salina fisiológica tamponada (PBS), a suspensão foi ajustada para 10⁶ células/mL.

Viabilidade celular

A viabilidade dos PMN 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, onde as suspensões celulares foram diluídas apropriadamente em solução de Azul de Trypan 0,4% e a viabilidade observada ao microscópio óptico comum. 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.

Ensaio de toxicidade

Para avaliação do efeito tóxico dos CPP, da caseína e do caseinato de sódio, concentrações crescentes (0,01 a 5%) foram adicionadas a 106 células e incubadas a 37 °C por duas horas em PBS suplementado pH 7,4 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mmol, Na_2HPO_4 150 mmol, NaCl 154 mmol, BSA 0,25%, glucose 0,1%, CaCl_2 0,9 mmol e MgCl_2 0,5 mmol). Em seguida, as células foram observadas quanto à viabilidade como descrito no item anterior e enumeradas. Cada experimento foi realizado em triplicata e, para o resultado, utilizou-se a média±desvio padrão (DP) de, pelo menos, três experimentos independentes, obtida em relação ao grupo de células não tratado, para o qual se atribuiu o valor de 100%.

Tabela 1. Caracterização físico-química e composição centesimal de caseinofosfopeptídeos (CPP) obtidos por hidrólise triptíca do caseinato de sódio (CaNa) em diferentes condições de tempo e temperatura.

PRODUTO	RENDIMENTO (%)	PROTEÍNAS (%)	CÁLCIO (mg/100g)	FÓSFORO (mg/100g)	SÓDIO (mg/100g)
CaNa	-	91,61a±0,95	131,69±6,4a	760,08±19,97a	1737,98±31,93a
CPP 2h/37°C	25,83a	84,86b±3,05	3450,03±83,33b	2574,09±66,05b	407,20±19,51b
CPP 2h/50°C	13,28b	71,00c±1,21	5132,88±95,47c	2863,02±32,45c	829,38±26,1c
CPP 4h/37°C	13,42b	73,59c±2,43	5146,18±482,24c	3099,27±6,85d	1182,94±244,05c,d
CPP 4h/50°C	12,81b	75,24c±3,75	5019,67±188,72c	2957,42±35,96c	1221,31±217,82d

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

Atividade antimicrobiana - Microdiluição em Caldo

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 enterica* serovar Enteritidis. As cepas foram preservadas a menos 20 °C em TSB/glicerol 20%. Aliquotas dessas suspensões bacterianas foram inoculadas em Ágar CLED e incubadas a 36 °C por 24 h para reativação. Colônias isoladas foram, então, individualmente inoculadas em meio TSA inclinado e re-incubadas por mais 24 h. A partir do meio TSA, foram feitos subcultivos em Ágar MacConkey para ambas as cepas. Após 24 h a 36 °C, 10 a 15 colônias isoladas de cada bactéria foram transferidas para frascos contendo salina estéril e a concentração bacteriana foi ajustada de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para o teste de microdiluição em caldo, as suspensões bacterianas com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland foram diluídas 1/10 em salina estéril e alíquotas de 5 µL foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços estéreis contendo previamente soluções dos CPP e do caseinato de sódio (2-0,25%, p/v) em meio Mueller-Hinton Broth. O controle consistiu de todos os componentes à exceção dos CPP e/ou caseinato de sódio. As placas foram, então, incubadas a 36 °C por 18 h e o crescimento bacteriano avaliado pela absorvância obtida em 620 nm (A_{620}); às culturas controle foi atribuído o valor de 100%. Cada teste foi realizado em triplicata e o resultado corresponde a média de duas séries de testes independentes em relação ao grupo controle.

Determinação do potencial antioxidante

O potencial antioxidante dos CPP foi avaliado pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ou TBARS (Hodges *et al.*, 1999). Para o preparo da fonte de lipídeos utilizou-se gema de ovo de galinha (5 g) filtrada e solubilizada em SDS (100 mL). Em frasco apropriado, foram adicionados 400 µL de água destilada, 100 µL de amostra (3 mg/mL), 50 µL de ABAP [cloreto de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) à 0,035%], 500 µL da solução de gema de ovo, 1,5 mL de solução

de ácido acético 20% e 1,5 mL de solução de TBA (0,4% de ácido tiobarbitúrico em solução 0,5% de SDS). A mistura foi submetida a 95 °C por 60 min em banho-maria. Após resfriamento, adicionou-se 1,5 mL de n-butanol, homogeneizou-se e centrifugou-se a 5.000 rpm/3 min; a absorvância do sobrenadante foi obtida em 532 nm (A). O mesmo processo foi realizado com soluções a 3 mg/mL de butil-hidroxi tolueno (BHT), vitamina E, vitamina C e quercetina, usados como parâmetros de comparação, aos quais foram adicionados todos os reagentes exceto as amostras, que foram substituídas por 100 µL de metanol. O branco da amostra foi preparado substituindo-se o ABAP por 50 µL de água. A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA), obtido em percentagem de acordo com a fórmula: $IAA\% = 1 - (A_{amostra} - A_{branco}) / A_{controle} \times 100$.

Análise estatística dos resultados

Para análise estatística dos resultados, foram utilizados o teste t e a Análise de Variância (ANOVA – *one way*) onde pertinente. O teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey. Os cálculos foram realizados utilizando-se o Programa *SPSS Statistics* 17.0, versão Windows (Chicago, IL), e valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Obtenção dos CPP

O procedimento envolvendo $CaCl_2$ em meio alcoólico em pH 4,6 durante a hidrólise triptíca do caseinato de sódio em diferentes tempos e temperatura de reação resultou em quatro frações de precipitados de CPP: 2h/37 °C, 2h/50 °C, 4h/37 °C e 4h/50 °C. Os hidrolisados obtidos apresentaram aspecto característico e semelhante, porém rendimento diferenciado (Tabela 1). A fração 2h/37 °C destacou-se por apresentar quantidade e conteúdo proteico superior em relação às demais, provavelmente devido às condições mais brandas empregadas.

A análise centesimal desses CPP (Tabela 1) mostrou que o conteúdo proteico foi também significativamente menor em relação aos dados observados para o caseinato de sódio e que, dentre as frações, a de teor proteico

significativamente maior foi observado para o CPP 2h/37 °C, enquanto os demais apresentaram resultados comparáveis aos de Ellegard e colaboradores (1999) e ligeiramente superiores ao relatado pelo grupo de Teucher (2006).

Com relação aos elementos cálcio e fósforo, todas as frações, independente das condições de reação empregadas, tiveram teores significativamente superiores ao observado para a matéria-prima (Tabela 1).

Os resultados mostram que o consumo de 20 a 30 g de CPP obtidos nas condições descritas poderia atender a 100% da recomendação diária adequada (RDA) de cálcio (Ross *et al.*, 2011), indicando que o processo empregado pode levar à utilização favorável desses produtos na suplementação e/ou enriquecimento de alimentos.

Com relação ao fósforo, a fração 4h/37 °C foi a que apresentou conteúdo superior (Tabela 1), indicando a presença de maior quantidade de peptídeos fosforilados. O fato de essas moléculas formarem sais orgânicos fosforilados solúveis as torna úteis na função de carreadores para diferentes minerais, especialmente o cálcio, agregando maior valor à sua utilização alimentar.

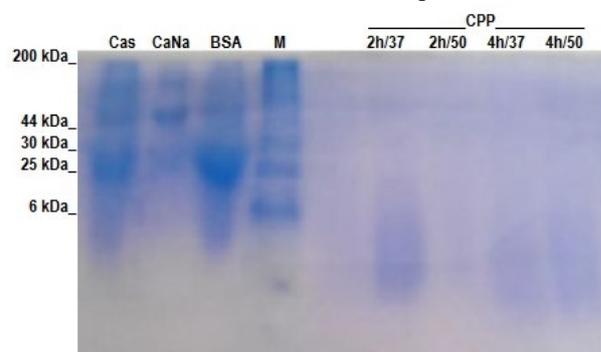
Em relação ao teor de sódio (Tabela 1), este foi proporcional às condições de reação, uma vez que a quantidade de hidróxido de sódio utilizada durante o processo para manter o pH estável da reação variou proporcionalmente com o tempo e a temperatura de reação. Contudo, é importante destacar que todas as frações de CPP apresentaram teores de sódio significativamente menores ($p < 0,05$) que o caseinato de sódio, fator importante quando se tem a intenção de suplementar alimentação de indivíduos com disfunção da pressão sanguínea.

O conhecimento do teor de umidade de matérias-primas tem grande importância na conservação, no armazenamento, 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 condições similares, 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 indicam que o processo para obtenção desta fração foi não só eficiente, como também enquadrou-se nos critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual determina que o teor de umidade em produtos biológicos alergênicos liofilizados seja inferior a 5% (Brasil, 2005). Observou-se que o teor de cinzas de $21,50 \pm 1,27\%$, determinado para esta mesma fração 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.

Caracterização dos CPP por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para analisar a presença de peptídeos de baixo peso molecular, amostras dos hidrolisados foram submetidas à

Figura 1. Separação eletroforética em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE) das frações de caseinofosfopeptídeos (CPP) obtidas após digestão triptica do caseinato de sódio em diferentes condições de tempo e temperatura, como indicado. Cas: caseína. CaNa: caseinato de sódio. BSA: soro albumina bovina. M: marcador de peso molecular.



SDS-PAGE em condições desnaturantes. Bandas largas e difusas na região reservada a moléculas de pequena massa molecular foram observadas em todas as amostras (Figura 1) após coloração com solução de Azul Brillante de Coomassie, confirmando que o processo de hidrólise levou à formação de conjuntos de peptídeos com tamanho inferior a 6 kDa, corroborando com a literatura (Sarmadi & Ismail, 2010).

Caracterização de CPP por análise em infusão direta em espectrômetro de massas

Com o objetivo de melhor caracterizar as frações de baixo peso molecular detectadas no ensaio eletroforético, foi empregada IES-EM. Como ilustrado na Figura 2, observa-se que, pelos picos de m/z , quanto maiores foram a temperatura e o tempo de hidrólise empregados, maior foi também a fragmentação proteica, culminando em menor tamanho molecular dos CPP. Ainda, dentre os processos, o único que apresentou fragmentos de massa superior a 1270 Da foi o que produziu a fração 2h/37 °C, corroborando com o que se espera quando um tempo de reação mais prolongado e/ou uma temperatura maior são empregados, pois condições essas favorecem a obtenção de fragmentos menores.

Miquel e colaboradores (2006) sugerem que CPP com massa molecular entre 527 e 6512 Da são candidatos que favorecem a absorção intestinal, com capacidade para desempenhar efeitos fisiológicos no organismo, uma vez que podem ser melhor absorvidos e mais facilmente transportados por mecanismos variados incluindo, dentre outros, as vias paracelular (difusão passiva) e intracelular (difusão facilitada) e o sistema linfático.

Determinação do conteúdo de aminoácidos por CLAE

Em seguida, a quantidade relativa de aminoácidos presentes em cada um dos CPP foi determinada por CLAE,

Tabela 2. Composição relativa de aminoácidos presentes nos lotes de caseinofosfopeptídeos (CPP) obtidos por hidrólise triptica de caseinato de sódio em diferentes condições.

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

*Alanina é um aminoácido não essencial. (n=2; p<0,05 - ANOVA, post-hoc Tukey). Letras denotam diferença estatística entre caseinofosfopeptídeos (CPP) de colunas diferentes.

Figura 2. Espectro de Massas de caseinofosfopeptídeos (CPP) obtidos após hidrólise triptica de caseinato de sódio sob condições controladas de tempo e temperatura como indicado, relacionando a concentração (abundância relativa) das diferentes massas obtidas (m/z).

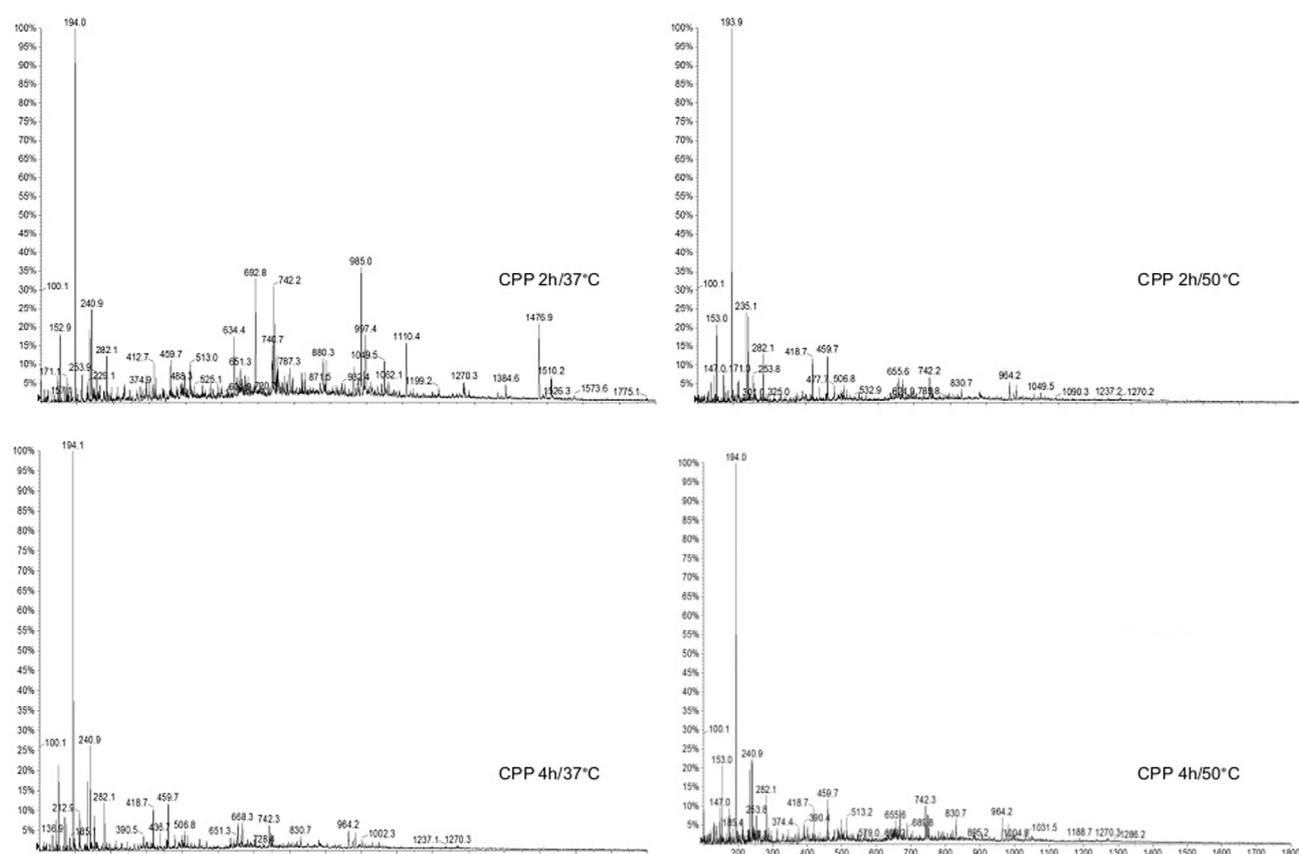
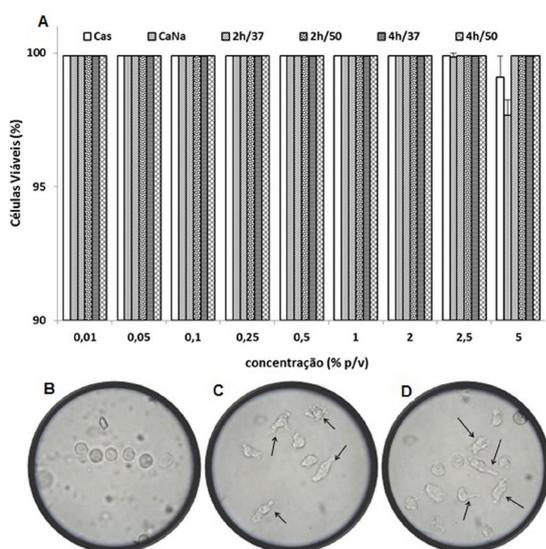


Figura 3. Toxicidade e ativação de polimorfonucleares induzida por caseinofosfopeptídeos. Polimorfonucleares obtidos de sangue periférico humano foram expostos às concentrações indicadas dos CPP e avaliados quanto à toxicidade, onde cada coluna representa a percentagem média±DP de leucócitos humanos periféricos recuperados, em relação ao grupo controle (A), obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Quando observados ao microscópio de luz comum, as células tratadas mostraram-se diferentes das do grupo controle (B) após exposição à solução a 1% do CPP 4h/50 °C (C) ou de caseína (D) por duas horas, com projeções citoplasmáticas múltiplas (setas), características de células ativadas (Aumento: 400x).

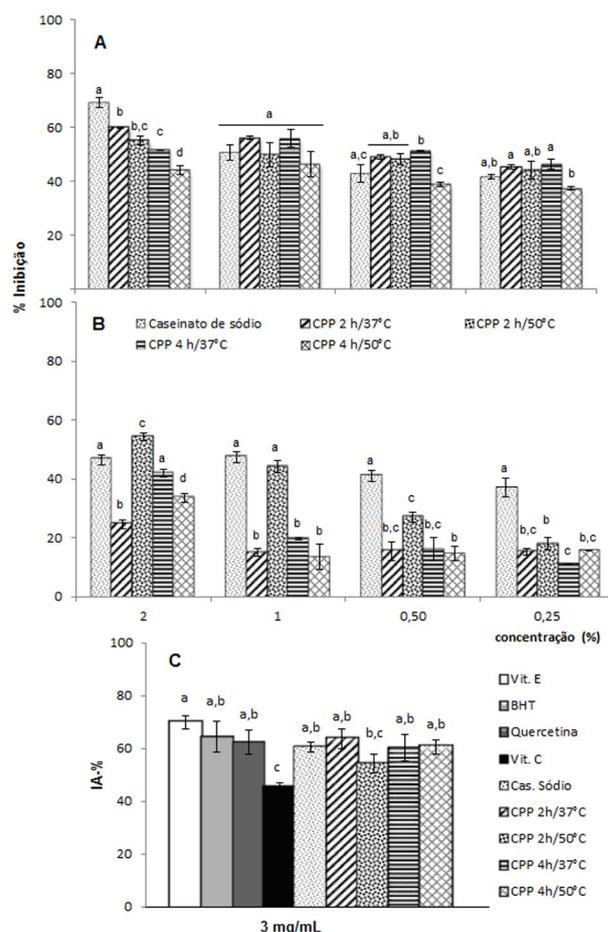


onde todos os hidrolisados apresentaram aminoácidos essenciais e não-essenciais em sua composição, cuja quantidade relativa, estabelecida por comparação com uma solução padrão comercial de aminoácidos, está apresentada na Tabela 2, e mostrou-se semelhante a outros estudos (Krüger & Cândido, 2009; Ellegard *et al.*, 1999).

Interessante, também, é observar a elevada concentração de ácido glutâmico e serina, provavelmente fosforilada, dentre os aminoácidos não essenciais detectados, que indicam êxito metodológico de obtenção de CPP. Ainda em relação aos aminoácidos não essenciais, maior quantidade de ácido aspártico foi observada para a fração 2h/37 °C, em contraste com a 4h/50 °C, na qual esse aminoácido foi detectado em níveis pelo menos seis vezes inferiores.

Asparagina e glutamina são aminas derivadas dos ácidos aspártico e glutâmico, respectivamente. Durante uma hidrólise ácida, como a ocorrida nos processos usados neste trabalho, ocorre clivagem de ligações aminas e a asparagina é convertida em ácido aspártico enquanto a glutamina passa a ácido glutâmico. Assim, a quantidade de ácido aspártico presente corresponde ao total de asparagina e, similarmente, ocorre com a glutamina.

Figura 4. Atividades antimicrobiana e antioxidante de caseinofosfopeptídeos. Efeitos de caseinofosfopeptídeos (CPP) obtidos por hidrólise do caseinato de sódio sobre o desenvolvimento de *Escherichia coli* (A) e *Salmonella* Enteritidis (B) pelo método de microdiluição em caldo (n=2; p<0,05; ANOVA, *post hoc* Tukey; letras distintas correspondem à diferença significativa entre as colunas, na mesma concentração), e sobre a atividade antioxidante pelo método TBARS (C), utilizando como padrões as vitaminas E e C, o BHT e a quercetina. Cada coluna representa o índice antioxidante médio em percentagem (IA±DP) de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata (p<0,05, ANOVA, *post hoc* Tukey; letras distintas correspondem à diferença significativa entre as colunas).



Atividades biológicas
Toxicidade

Por expressarem receptores opioides, sendo prontamente responsivos à caseína e seus fragmentos *in vitro* (Wilkinson, 1979), e extremamente sensíveis à condições ambientais desfavoráveis, PMN obtidos de sangue periférico de indivíduos sadios foram expostos às concentrações crescentes dos CPP para se avaliar a toxicidade dessas moléculas. Efeitos obtidos com exposição à caseína e ao caseinato de sódio foram usados como parâmetros de comparação. Os resultados, apresentados na Figura 3A, foram normalizados em relação aos controles, constituídos de populações não expostas às substâncias em estudo e para os quais se atribuiu o valor 100%.

Em todas as concentrações dos agentes em teste observou-se comportamento semelhante, não sendo evidenciado efeito tóxico, onde >95% das células recuperadas mostraram-se incolores e brilhantes, indicando, por um lado, que os procedimentos adotados não interferiram nas características estimuladoras dos CPP para PMN e, por outro lado, não deixaram resíduos que pudessem comprometer a sua viabilidade.

É interessante ressaltar que PMN são células extremamente sensíveis ao ambiente em que estão, respondendo prontamente a estímulos e, nesta série de experimentos, foi possível observar ao microscópio que os leucócitos expostos apresentavam-se vivos, refringentes e polarizados, com várias projeções citoplasmáticas características de células estimuladas, confirmando sua ativação pelos CPP (Figura 3C) e pela caseína (Figura 3D), em nítido contraste com as células não estimuladas (Figura 3B) presentes no grupo controle.

Ação antimicrobiana

Com o objetivo de avaliar se os CPP produzidos pela metodologia proposta neste trabalho teriam a habilidade de inibir a proliferação bacteriana como já amplamente descrito para outras moléculas lácteas, usou-se o teste de susceptibilidade através do método quantitativo de microdiluição em caldo usando cepas de *E. coli* e de *Salmonella* Enteritidis, as quais foram expostas a concentrações crescentes das frações de CPP.

Embora o mecanismo de ação pelo qual hidrolisados proteicos apresentam atividade contra bactérias gram-negativas não seja claro, em relação a *E. coli* (Figura 4A), observou-se que todas as frações foram eficazes para conter sua proliferação, e que esta atividade pouco variou quando o tempo e a temperatura de hidrólise utilizados para a produção dos CPP foram considerados.

Quando um isolado clínico de *Salmonella* Enteritidis foi usado, o perfil de ação das frações de CPP mostrou-se independente, variando proporcionalmente com a concentração utilizada (Figura 4B). Entretanto, todas as frações mostraram ação inibidora da proliferação, com destaque para o CPP 2h/50 °C a 2%.

Potencial antioxidante

Utilizando o método do TBARS, o potencial antioxidante dos hidrolisados foi evidenciado (Figura 4C), onde a atividade foi estatisticamente semelhante aos efeitos observados para a vitamina E, a quercetina e o BHT, e significativamente superior ao demonstrado pela vitamina C, substâncias antioxidantes de referência e usadas como parâmetro de comparação.

DISCUSSÃO

Como a base da funcionalidade de proteínas alimentares é relacionada aos seus atributos intrínsecos envolvendo tamanho e composição de aminoácidos, bem como suas características físico-químicas, e a incorporação

de fragmentos proteicos está cada vez mais presente na alimentação humana, este trabalho avaliou a influência do tempo (2 e 4 horas) e da temperatura de reação (37 e 50 °C) na composição e atividades biológicas de CPP obtidos por fragmentação triptica controlada do caseinato de sódio. O objetivo de empregar a temperatura de 37 °C, além da temperatura de 50 °C, ideal para a atividade de enzimas comerciais, bem como 2 e 4 horas de reação para obtenção dos CPP, foi no sentido de aproximar a metodologia *in vitro* das condições da digestão gastrointestinal que ocorrem *in vivo*.

Os resultados desses procedimentos mostram que, embora em concentrações distintas, todos os hidrolisados apresentaram fragmentos proteicos particularmente ricos em cálcio e fósforo, e constituídos por aminoácidos essenciais e não essenciais, incluindo ácidos aspártico e glutâmico, serina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina e lisina, cuja quantidade foi semelhante aos da literatura (Ellegard *et al.*, 1999; Krüger & Cândido 2009), apesar de diferenças entre os métodos de quantificação. Ainda, demonstram a importância desses fragmentos em termos nutricionais, pois segundo Moraes e colaboradores (2002), uma proteína de alta qualidade contém aminoácidos essenciais em proporções similares àquelas necessárias ao ser humano.

Vale a pena ressaltar que, dentre os aminoácidos essenciais mais abundantes encontrados nesses hidrolisados, destacaram-se a leucina, a isoleucina e a valina, denominados *Branched-Chain Amino Acids*, ou BCAA, por possuírem cadeia ramificada, descritos como indispensáveis à alimentação humana pela relevância na manutenção da proteína corporal e para a síntese de alanina e glutamina (Blomstrand *et al.*, 2006). Neste sentido, enquanto a leucina estimula a síntese proteica por atuar sobre a quinase *mammalian Target of Rapamycin – mTor*, a isoleucina estimula a captação de glicose no músculo, sendo a valina o principal substrato para a transaminação (Valerio *et al.*, 2011). Assim, a presença de BCAA poderia 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 (Power *et al.*, 2013; Rogero & Tirapegui, 2008).

Já entre os aminoácidos não essenciais, foi notável a elevada concentração de ácido glutâmico. Com relação ao ácido aspártico, maior quantidade foi registrada para o CPP 2h/37, em contraste com a fração 4h/50, na qual esse aminoácido foi detectado em níveis pelo menos seis vezes inferiores. No contexto desses dois aminoácidos, é importante ressaltar que 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.

A retenção da capacidade antioxidante comum aos CPP foi também observada para as frações produzidas, a qual foi inclusive superior à demonstrada pela vitamina C. Esta ação biológica também tem correlação positiva com o conteúdo aminoacídico e, neste contexto, estudos recentes têm demonstrado mecanismos antioxidantes diversos exibidos por peptídeos liberados pela hidrólise da caseína ou seus derivados, envolvendo proteção contra a peroxidação lipídica (Sarmadi & Ismail, 2010), por intervirem no conteúdo de glutatona e na atividade da catalase, duas das enzimas mais importantes na manutenção do potencial antioxidante celular (García-Nebot *et al.*, 2010) ou, ainda, por agirem como sequestradores de radicais livres, bem como quelantes de metais de transição como cálcio, ferro, cobre e zinco (Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2000).

Por exemplo, a fenilalanina, juntamente com a tirosina, pela presença de anel aromático na cadeia N-terminal, apresenta potencial antioxidante pela capacidade de doar prótons a elétrons desemparelhados. Aminoácidos hidrofóbicos N-terminais, como a valina e a leucina, podem aumentar a solubilidade de peptídeos em uma matriz lipídica, facilitando o acesso a espécies reativas hidrofóbicas ou a ácidos graxos poli-insaturados (Power; Jakeman; FitzGerald, 2013). Dessa forma, é provável que a presença desses aminoácidos nos CPP tenha contribuído favoravelmente para com sua atividade antioxidante.

Serina, provavelmente fosforilada, foi também detectada em concentrações elevadas dentre os aminoácidos não essenciais. Se, por um lado, este dado pode ser indicativo de êxito metodológico de obtenção de CPP, por outro lado há relatos de que o principal componente responsável pela 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 (Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2000). Ainda, esses resíduos catalisam a oxidação do ferro da forma ferrosa (Fe⁺²) para o estado férrico (Fe⁺³), formando assim, um complexo de ferro-fosfoproteína altamente estável (Kitts, 2005).

Kitts (2005) também cita 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 de 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 que grupos não fosforilados, como os ácidos glutâmico e aspártico, podem ser os responsáveis pela inibição da peroxidação lipídica (García-Nebot *et*

al., 2010). Outros autores também destacam a ação anti-radicalar da histidina, lisina, prolina, tirosina (Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2000), metionina e arginina (Power *et al.*, 2013; Sarmadi & Ismail, 2010).

A atividade antioxidante não depende apenas da presença de resíduos de aminoácidos específicos, mas também da localização dos aminoácidos dentro da sequência peptídica. Portanto, é provável que as poucas diferenças de potencial antioxidante observadas para os CPP sejam decorrentes da somatória desses mecanismos.

Deve-se ressaltar que, apesar do caseinato de sódio apresentar propriedades antioxidantes semelhantes às observadas para seus hidrolisados, sua adição aos alimentos não é favorecida pela insolubilidade em pH próximo de 4,6. Além disso, sua proteína pode afetar os parâmetros de qualidade dos alimentos, tais como textura e cor (Díaz *et al.*, 2003). Caseinofosfopeptídeos obtidos com uma ou outra das metodologias descritas neste trabalho constituem, portanto, opções importantes para garantir parâmetros de qualidade em alimentos, como já referido por outros (Phelan *et al.*, 2009).

Nesse estudo observou-se que alterações no tempo e na temperatura de hidrólise triptica para a obtenção de fragmentos proteicos do caseinato de sódio levam a diferenças físico-químicas significativas, assim como no tamanho molecular e na composição aminoacídica dos produtos, mas que provavelmente não comprometem seu uso como parte de uma alimentação segura, pois se mostraram isentos de toxicidade.

Esta afirmação tem suporte nos resultados obtidos com os ensaios realizados com PMN periféricos, principais protagonistas da resposta inflamatória inata, onde não se evidenciou nenhum efeito tóxico dos CPP sobre essas células, com manutenção da viabilidade celular superior a 95%, sugerindo, portanto, serem seguros às células humanas nas condições experimentais usadas, corroborando com dados similares da literatura (Jaziri *et al.*, 1992). Neste sentido, há mais estudos que também avaliaram a toxicidade de CPP, mas sobre outros tipos celulares e em diferentes concentrações, demonstrando que tanto o caseinato de sódio quanto os seus hidrolisados não induziram alterações da membrana celular (Phelan *et al.*, 2010). Ainda, esses resultados são compatíveis com estudos sobre os efeitos de CPP na dieta humana, onde se observou a inexistência de toxicidade para a saúde dos indivíduos (Teucher *et al.*, 2006).

Entretanto, como trabalhos sobre a segurança da ingestão de peptídeos sobre a saúde humana são ainda escassos e a maioria das pesquisas com CPP concentra-se na sua eficácia dietética e não na sua segurança, como bem colocado por Schaafsma (2009), estudos mais aprofundados devem ser realizados como garantia de seu uso seguro.

Um aspecto relevante observado durante esta série de experimentos foi com relação ao aspecto morfológico adquirido pelos PMN logo após o contato com os CPP, quando múltiplas projeções citoplasmáticas foram notadas, caracterizando sua ativação. Leucócitos, particularmente

os PMN, respondem a estímulos ambientais por meio de receptores expressos na membrana citoplasmática (Bokoch, 1995). A ativação de um receptor reside na sua interação com agentes estimulantes, e esta ligação direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de uma ou mais atividades celulares, incluindo os mecanismos observados nas respostas inflamatórias.

Se, por um lado, receptores que se acoplam à caseína já foram descritos para PMN (Lewis SL & Van Epps, 1983), sabe-se também que a caseína, assim como seus fragmentos, devido a sua natureza opióide (Wilkinson, 1979), tem ação regulatória sobre a resposta inflamatória, a qual está diretamente associada à resposta imunológica inata (Mills *et al.*, 2011).

Como a característica básica de um infiltrado inflamatório na fase aguda consiste na predominância de PMN em razão de sua maior responsividade e agilidade de movimentação frente a fatores quimiotáticos (Rigby & Deleo, 2012), o fato de os CPP terem promovido a ativação dos PMN têm especial relevância quando associado ao efeito inibidor do desenvolvimento de colônias de bactérias intestinais patogênicas, como *E. coli* e de *Salmonella* Enteritidis, incentivando não só a aplicação desses CPP como alimento alternativo, mas principalmente como suplemento em situações especiais que envolvem pacientes com comprometimento gastrointestinal decorrente de inflamações.

CONCLUSÃO

Uma das mais importantes áreas de interesse referentes às proteínas e peptídeos alimentares é estabelecer relações entre estrutura e funcionalidade desses componentes. Nesse trabalho observou-se que mudanças na temperatura e no tempo de reação de hidrólise triptica do caseinato de sódio para a obtenção de CPP levam a diferenças significativas na composição físico-química e aminoacídica dos produtos. Porém, essas diferenças parecem não comprometer seus atributos biológicos, pois observou-se que as propriedades antibacteriana e antioxidante, tradicionalmente descritas para esses tipos de produtos, são preservadas, sugerindo que os hidrolisados assim produzidos podem ser úteis na conservação de alimentos, além de adicionar valor nutricional aos alimentos tradicionais, naturais e orgânicos. Ainda, podem ser empregados para conter a proliferação de bactérias em situações que envolvem distúrbios gastrointestinais, modulando a flora microbiana.

Portanto, o conjunto de dados apresentados neste trabalho para a obtenção de hidrolisados proteicos pode ser considerado como uma estratégia efetiva para o desenvolvimento de produtos que, simultaneamente, servem como promotores da saúde e coadjuvantes na prevenção de doenças, atenuando também efeitos decorrentes da ação de radicais livres. Sua ação antibacteriana, assim como a ausência de toxicidade para células tão sensíveis como leucócitos periféricos humanos, favorecem sua aplicação

como ingredientes em situações especiais que envolvem pacientes desnutridos, imunossuprimidos, que apresentem comprometimento ósseo ou gastrointestinal decorrente de inflamações e infecções, contribuindo para a segurança alimentar e nutricional desses grupos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve o apoio financeiro da CAPES por meio de bolsa de mestrado a TRM. Os autores são gratos a Lactoprot Deutschland GmbH e a Novozymes, por terem cedido, respectivamente, o caseinato de sódio e a enzima tripsina para a realização desse estudo.

ABSTRACT

Physico-chemical quality and biological activities of Casein phosphopeptides obtained by sodium caseinate tryptic hydrolysis under different conditions

Several methods have been employed for the production of bioactive peptides for health promotion. The aim of this study was to produce and characterize Casein phosphopeptides obtained by sodium caseinate tryptic hydrolysis under different temperatures (37 and 50 °C) and reaction times (2 and 4 h), and evaluate their biological capabilities. They have been characterized by assessing their centesimal composition, by polyacrylamide gel electrophoresis, Mass Spectrometry, and High-Performance Liquid Chromatography. The biological activities tested included toxicity for human leukocytes, antimicrobial assay using the microdilution test, and determination of the antioxidant capacity by the thiobarbituric acid reactive species method. The results showed that the four fractions obtained were of low molecular weight with high protein and mineral contents; their amino acid profile showed high and differentiated amounts of glutamic acid and serine independent of the methodological procedures. The results also showed no toxicity for human peripheral leukocytes, demonstrated antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis as well as high antioxidant capacity. The results of the physico-chemical Casein phosphopeptides' fractions showed high nutritional composition in terms of protein and, particularly, calcium. The biological assays indicated that time and temperature changes in the process for obtaining casein hydrolysates have not interfered with their biological qualities. In addition, they have proven safe in promoting health in special conditions involving malnourished and/or, immunocompromised patients or those with bone and/or gastrointestinal impairment due to inflammations and infections.

Keywords: *Casein phosphopeptides*. Sodium caseinate. Cytotoxicity. Antimicrobial activity. Antioxidant activity.

REFERÊNCIAS

- Adamson NJ, Reynolds EC. Characterization of tryptic *Casein phosphopeptides* prepared under industrially relevant conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1995;45(3):196-204.
- Blomstrand E, Eliason J, Karlsson HKR, Köhnke R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after exercise. *J Nutr.* 2006;136(1):269-73S.
- Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood.* 1995;86(5):1649-60.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 233, de 17 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Produção e Controle de Qualidade para Registro, Alteração Pós-Registro e Revalidação dos Extratos Alergênicos e dos Produtos Alergênicos. Diário Oficial da União, nº 161, 22 de agosto de 2005, Seção 1, p.48.
- Cánovas JM, Rentero P, Martínez AMC, Hernández ML, Alemán JA. Péptidos bioactivos. *Clín Invest Arterioscl.* 2011;23(5):219-27.
- Centro de Pesquisa e Processamento se Alimentos (CEPPA). Determinação dos elementos por ICP-OES. PE-LE-032/R04. Curitiba; 2012.
- Díaz M, Dunn CM, McClements DJ, Decker EA. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem.* 2003;51(8):2365-70.
- Ellegard KH, Gammelgard-Larsen C, Sorensen ES, Fedosov S. Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive *Casein phosphopeptides*. *Int Dairy J.* 1999;9:639-52.
- Fiat AM, Migliore D, Jolles P. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunostimulating activities. *J Dairy Sci.* 1993;76:301-10.
- García-Nebot MJ, Alegría A, Barberá R, Contreras MDM, Recio I. Milk versus caseinophosphopeptides added to fruit beverage: resistance and release from simulated gastrointestinal digestion. *Peptides.* 2010; 31(4):555-61.
- Hartmann R, Meise H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(2):163-69.
- Heinrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem.* 1984;74(136):65-74.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 1999;207(4):604-11.
- Horwitz W. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. 15 ed. Arlington: AOAC Inc.; 1990.
- Jaziri M, Migliore-Samour D, Casabianca-Pignède MR, Keddad K, Morgat JL, 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.
- Kitts DD, Yuan YV. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci Technol.* 1992;3:31-35.
- Kitts DD. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16(12):549-54.
- Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J.* 2006;16(9):945-60.
- Krüger CCH, Cândido LMB. Caseinofosfopeptídeos: obtenção e atividade biológica. *Alim Nutr.* 2009;20(1):167-73.
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-85.
- Lewis SL, Van Epps DE. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation.* 1983;7, 363-75.
- 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.
- Meisel H, Bernard H, Fairweather-Tait S, Fitzgerald RJ, Hartmann R, Lane CN, McDonagh D, Teucher B, Wal JM. Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br J Nutr.* 2003;89(3):351-59.
- Mills S, Ross RP, Hill, C, Fitzgerald GF, Stanton C. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J.* 2011;21(6):377-401.
- Miquel E, Gómez JA, Alegría A, Barberá R, Farré R, Recio I. Identification of *Casein phosphopeptides* in β -casein and commercial hydrolysed casein by mass spectrometry. *Food Sci Technol Int.* 2006;12(5):379-84.
- Morais HA, Barbosa CMS, Lopes DCF, Oliveira MC, Silvestre MAPC. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. *ALAN* 2002;52(1):77-83.
- Nongonierma AB, Fitzgerald RJ. Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Res.* 2012;46(3):234-67.
- Phelan M, Aherne A, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int Dairy J.* 2009;19(11):643-54.

Power O, Jakeman P, Fitzgerald RJ. 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.

Rigby KM, Deleo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol*. 2012;34(2):237-59.

Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Braz J Pharm Sci*. 2008;44(4):563-75.

Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington: National Academies Press; 2011.

Sarmadi BH, 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):1161-68.

Scholz-Ahrens KE, 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(Suppl 1):147-53.

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

Urista CM, Fernández RA, Rodríguez FR, Cuenca AA, Jurado AT. Review: production and functionality of active peptides from milk. *Food Sci Technol Int*. 2011;17(4):293-317.

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

Wilkinson PC. Synthetic peptide chemotactic factors for neutrophils: the range of active peptides, their efficacy and inhibitory activity, and susceptibility of the cellular response to enzymes and bacterial toxins. *Immunology*. 1979;36(3):579-88.

Recebido em 24 de março de 2014

Aceito em 04 de junho de 2014