UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

GABRIELLY HILÁRIO DA SILVA

Peptídeos anti-hipertensivos extraídos da cianobactéria *Arthrospira platensis*

RECIFE
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

H641p Hilário da Silva, Gabrielly
Peptídeos anti-hipertensivos extraídos da cianobactéria Arthrospira platensis / Gabrielly Hilário da Silva. - 2022.
121 f. : il.

Orientadora: Raquel Pedrosa Bezerra.
Coorientador: Leucio Duarte Vieira Filho.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Alga. 2. Digestão gastrointestinal in vitro. 3. Hipertensão arterial. 4. Doenças renais. 5. Alimento funcional. I. Bezerra, Raquel Pedrosa, orient. II. Filho, Leucio Duarte Vieira, coorient. III. Título

CDD 636.089

GABRIELLY HILÁRIO DA SILVA

Peptídeos anti-hipertensivos extraídos da cianobactéria *Arthrospira platensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

RECIFE

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELLY HILÁRIO DA SILVA

Peptídeos anti-hipertensivos extraídos da cianobactéria *Arthrospira platensis*

Este trabalho foi defendido à banca em 25/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof.ª Dr.ª Raquel Pedrosa Bezerra
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE
Orientadora

_____

Prof.ª Dr.ª Tatiana Souza Porto
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE
Avaliadora

_____

Prof.ª Dr.ª Livia Seno Ferreira Camargo
Universidade Federal do ABC - UFABC
Avaliadora

_____

Prof. Dr. Romero Marcos Brandão-Costa
Universidade de Pernambuco - UPE
Avaliador

Dedico este trabalho a minha mãe que sempre me proporcionou todo o suporte para seguir perseguindo meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lúcia Hilário, por ser a pessoa que mais torce por mim e que me faz ser quem sou. É por ela que avanço.

Aos meus amigos e amigas, que, ao longo de toda a caminhada na pós-graduação, foi uma rede de apoio importantíssima para mim. Essa conquista também é de vocês.

À minha irmã que a vida me proporcionou, Jacira Silva, por todo o amor, acolhimento e torcida de sempre.

À professora Raquel Pedrosa, com quem tive o privilégio de aprender durante esses anos de orientação. Sou muita grata pela confiança e respeito em todas as trocas. Tenho total admiração pelo seu trabalho e pela pessoa que se é.

Ao professor Leucio Duarte pelo suporte e disponibilidade sempre que necessário.

À todo o grupo do LABTECBIO, liderado pela professora Ana Porto, por me acolherem e ensinarem tanto, em toda a minha formação enquanto pesquisadora.

À minha banca formada pelas professoras Tatiana Porto e Livia Seno e o professor Romero Brandão por tantas contribuições que abrilhantaram ainda mais o meu trabalho. Tenho muita admiração por todos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter sido minha segunda casa ao longo dos anos, e ter possibilitado o encontro com tantas pessoas que me marcaram ao longo da minha trajetória acadêmica.

Às instituições de fomento à pesquisa, CNPQ/CAPES e FACEPE pelas bolsas concedidas.

Em especial, ao saudoso professor Paulo Freire, por me inspirar todos os dias a sonhar com uma sociedade mais equilitária, justa e comprometida com uma educação libertadora e transformadora.

Por fim, a mim mesma, por me reconhecer tão persistente e determinada diante de tantos desafios, sobretudo, num período tão duro de pandemia da COVID-19 que enfrentamos ao longo desses anos. Me sinto abençoada em conseguir concluir esse ciclo importante da minha vida.

Nós, mulheres e homens, viramos seres na história que não prescindem do amanhã. Quer dizer, nós somos seres em busca sempre de um amanhã, que por sua vez não está ali à espera da gente, mas que é o resultado do que a gente faça pela transformação do presente que a gente vive, com a iluminação do ontem que a gente viveu. Ora, se nós somos seres incapazes de abandonar a perspectiva de um amanhã que tem que ser feito por nós, como tirar da nossa experiência histórica o sonho? Não é possível viver sem sonho. Sonho enquanto projeto, enquanto programa. (PAULO FREIRE, 1993, não paginado).

RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença silenciosa e com etiologia relacionada a fatores genéticos, hábitos de vida e ambientais; e pode levar ao surgimento de doenças cardiovasculares. Alguns tratamentos farmacológicos são comumente utilizados na prática clínica, incluindo o uso de fármacos da classe de inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina-1 (ECA1). Apesar de apresentarem respostas satisfatórias para a diminuição da pressão arterial, pacientes crônicos apresentam diversos efeitos colaterais, como: tosse seca, hipotensão ortostática na primeira dose, erupção cutânea, perda do paladar, proteinúria, leucopenia e hipersensibilidade com edema angioneurótico. E em caso de mulheres grávidas hipertensas, pode levar a complicações no desenvolvimento fetal. A cianobactéria *Arthrospira platensis (sin. Spirulina platensis*) tem se destacado por produzir diferentes bioativos de importância biotecnológica aplicada à saúde como, por exemplo, peptídeos com ação anti-hipertensiva. O objetivo deste estudo foi produzir e extrair peptídeos da biomassa da *A. platensis* após o processo de digestão gastrointestinal (DGI) simulada *in vitro* utilizando as enzimas pepsina e pancreatina e avaliá-los quanto a atividade inibitória da ECA1 (iECA). Inicialmente, revisamos sistematicamente o uso de algas como fonte de peptídeos iECA e os resultados apontam que as divisões *Chlorophyta* e *Rhodophyta*, para as macroalgas, e as divisões *Chlorophyta*, *Ochrophyta e Haptophyta*, para as microalgas, são as mais estudadas como fonte de peptídeos iECA. As enzimas bromelaína e termolisina são as mais utilizadas para extrair peptídeos anti-hipertensivos com as principais características: baixo peso molecular, sequência curta de peptídeos e padrão de inibição não-competitivo. Também avaliamos os efeitos nefroprotetores da *Arthrospira (sin. Spirulina)* e do fotopigmento C-ficocianina, em contexto de doenças renais em modelos pré-clínicos, através de revisão sistemática e meta-análise. Os resultados sugerem que o uso nutracêutico da *Spirulina* e/ou C-ficocianina melhorou a resposta dos biomarcadores clássicos de função renal creatinina sérica, ácido úrico e ureia. Para proteinúria, não houve melhora. Além disso, verificamos a diminuição dos níveis de pressão arterial sistólica em contexto de hipertensão arterial. Por fim, a invenção de um produto constituído por peptídeos anti-hipertensivos extraídos de microrganismos fotossintetizantes presentes na biomassa celular hidrolisada ou peptídeos purificados encapsulados em biopolímero. Estes resultados corroboram com a potencial utilização dos peptídeos presentes na *Arthrospira platensis* (*sin. Spirulina platensis*) na formulação de drogas anti-hipertensivas ou alimentos nutracêuticos, como também sugere maiores investigações sobre o uso da *Spirulina* para o tratamento de doenças renais.

Palavras-chave: alga, hidrólise enzimática, cinética de inibição, encapsulamento, nutracêutico, hipertensão arterial, meta-análise, doenças renais.

ABSTRACT

Hypertension is a silent disease with etiology related to genetic, lifestyle and environmental factors; and it can lead to the development of cardiovascular diseases. Some pharmacological treatments are commonly used in clinical practice, including the use of drugs of the Angiotensin-converting enzyme-1 (ACE1) inhibitor class. Despite presenting satisfactory responses to the lowering of blood pressure, chronic patients have several side effects, such as: dry cough, orthostatic hypotension on the first dose, skin rash, loss of taste, proteinuria, leukopenia, and hypersensitivity with angioneurotic edema. And in case of hypertensive pregnant women, it can induce complications in fetal development. The cyanobacterium *Arthrospira platensis (syn. Spirulina platensis*) has been highlighted for producing different bioactives of biotechnological importance applied to health, such as peptides with antihypertensive action. The objective of this study was to produce and extract peptides from *A. platensi*s biomass after simulated gastrointestinal digestion (DGI) in vitro using the enzymes pepsin and pancreatin, and to evaluate them for ACE1 inhibitory activity (iECA). Initially, we systematically reviewed the use of algae as a source of iECA peptides and the results indicate that the *Chlorophyta* and *Rhodophyta* divisions, for macroalgae, and the *Chlorophyta*, *Ochrophyta* and *Haptophyta* divisions, for microalgae, are the most studied as a source of iECA peptides. The enzymes bromelain and thermolysin are the most widely used to extract antihypertensive peptides with the main characteristics: low molecular weight, short peptide sequence and non-competitive inhibition pattern. We also evaluated the nephroprotective effects of *Arthrospira (syn. Spirulina*) and the photopigment C-ficocyanin, in the context of renal diseases in preclinical models, through systematic review and meta-analysis. The results suggest that nutraceutical use of *Spirulina* and/or C-ficocyanin improved the response of classical biomarkers of renal function serum creatinine, uric acid and urea. For proteinuria, there was no improvement. Furthermore, we verified a decrease in blood pressure levels in the context of hypertension. Finally, the invention of a product consisting of antihypertensive peptides extracted from photosynthesizing microorganisms present in hydrolyzed cellular biomass or purified peptides encapsulated in biopolymer. These results support the potential use of peptides present in *A. platensis (syn. Spirulina platensis*) in the formulation of antihypertensive drugs or nutraceutical foods, as well as suggest further investigations on the use of Spirulina for the treatment of renal diseases.

Keywords: *algae*, enzymatic hydrolysis, inhibition kinetics, encapsulation, nutraceutical, hypertension, meta-analysis, kidney diseases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Microscopia Eletrônica de Varredura da *Spirulina platensis* com parte do tricoma helicoidal em espiral contínuo (A), foto microscópica da *Spirulina platensis* ampliada em 400x (B)..... . 5

FIGURA 2 – Etapas do mecanismo de ação do Sistema Renina Angiotensina na Hipertensão Arterial 10

FIGURA 3 – Estrutura cristalina em 3D da Enzima Conversora de Angiotensina Humana-1 em complexo com o inibidor omapatrilato..... 11

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – Fluxograma para identificação e seleção de estudos adaptado de Moher *et al.* (2009). 27

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – Processo de Digestão Gastrointestinal *In Vitro*..... 48

FIGURA 2 – Atividade inibitória da Enzima Conversora de Angiotensina-I em porcentagem das frações < 3kDa (AP-3) 52

FIGURA 3 – Purificação de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina-I do hidrolisado da cianobactéria *A. platensis* digerida com as enzimas pepsina e pancreatina. Eluição da fração AP-3 (< 3kDa) com Tris-HCl (0,1M) em coluna de gel filtração Superdex G75…….....53

FIGURA 4 – Purificação de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina-I do hidrolisado da cianobactéria *A. platensis* digerida com as enzimas pepsina e pancreatina. Eluição da

fração AP-3 (Superdex-G75) com acetonitrila em TFA 0,1% em coluna de fase reversa RP – FPLC 54

CAPÍTULO V

FIGURA 1 – Diagrama de fluxo dos estudos (Prism 8.0.1 2018)..... 73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

TABELA I – Avaliação do risco de enviesamento e critérios de qualidade dos estudos selecionados para a revisão sistemática sobre os peptídeos iECA de algas 28

QUADRO II – Porcentagem de respostas positivas (sim) para cada critério de qualidade 29

QUADRO III - Peptídeos inibitórios da ECA derivados de algas 30

QUADRO IV - Efeitos da administração de hidrolisados e peptídeos derivados de algas na pressão arterial sistólica (PAS) em ratos espontaneamente hipertensivos 32

CAPÍTULO II

TABELA 1. Atividade inibitória em diferentes pesos moleculares do hidrolisado pós-digerido da cianobactéria *A. platensis* 51

CAPÍTULO V

Tabela 1-A. Resumo dos estudos selecionados para a variável creatinina sérica (CS) (mg/dL). 91

Tabela 1-B. Resumo dos estudos selecionados para a variável ácido úrico (AU) (mg/dL). 93

Tabela 1-C. Resumo dos estudos selecionados para a variável ureia (U) (mg/dL) 94

Tabela 1-D. Resumo dos estudos selecionados para a variável proteinúria (PTU) (mg/dL) 96

Tabela 1-E. Resumo dos estudos selecionados para a variável pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) 97

TABELA 2-A – Sumários dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou c-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal creatinina sérica (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise 75

TABELA 2-B – Sumários dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou c-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal ureia (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise 77

TABELA 2-C– Sumários dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou c-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal ácido úrico (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise..... 79

TABELA 2-D– Sumários dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *spirulina* ou c-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal proteinúria (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise..... 81

TABELA 2-E– Sumários dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *spirulina* ou c-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta a pressão arterial sistólica (mmHg). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise.
. 83

ABREVIATURAS

AGT	Angiotensinogênio
ANG-1	Angiotensina-1
ANG-2	Angiotensina-2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT_1R	Receptor de angiotensina tipo 1
AT_2R	Receptor de angiotensina tipo 2
BCA	Ácido bicinconínico
Cl^-	Cloreto
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DGI	Digestão Gastrointestinal
dL	Decilitro
DM	Diferença entre médias
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GPI	Glicosilfosfatidilinosito
GRAS	Generally Regarded As Safe
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HHL	Hipuril histidil leucina
IC_{50}	Concentração mínima para inibir 50% da atividade específica
kDa	Quilodaltons
K_m	Constante de Michaelis
mg	Miligrama

mm	Milímetro
mM	Milimolar
ONU	Organização das Nações Unidas
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PTU	Proteinúria
SBP	Systolic blood pressure
CS	Creatinina sérica
Sin	Sinônimo
SRA	Sistema renina-angiotensina
U	Ureia
AU	Ácido Úrico
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UTEX	Universidade do Texas
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
Zn	Zinco
μM	Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO DE LITERATURA **3**

2.2 Características gerais da cianobactéria *Arthrospira platensis (sin. Spirulina platensis)*..... **3**

2.2.1 Taxonomia 3

2.2.2 Habitat, morfologia, composição bioquímica e formas de cultivo 3

2.2.3 Uso da *Spirulina* como suplemento alimentar 6

2.2.4 Algas e cianobactérias como fonte de peptídeos anti-hipertensivos 7

2.3 Hipertensão Arterial (HA) 8

2.3.1 Definição e aspectos epidemiológicos 8

2.3.2 Fisiopatologia da HA e Sistema Renina-Angiotensina (SRA) 9

2.3.3 Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) 11

2.3.4 Abordagens terapêuticas atuais: inibidores da ECA 12

2.3.5 Hipertensão Arterial e COVID-19 13

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 14

4. OBJETIVOS 20

4.1 Objetivo geral 20

4.2 Objetivos específicos 20

CAPÍTULO I- AS ALGAS COMO FONTE DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA 21

RESUMO 22

INTRODUÇÃO 23

MATERIAIS E MÉTODOS 25

Estratégia de busca 25

Critérios de elegibilidade 25

Avaliação do risco de viés e critérios qualitativos 25

RESULTADOS 26

Métodos de produção dos peptídeos iECA 33
Métodos de inibição da ECA *in vitro* 33
Análise do potencial anti-hipertensivo de peptídeos contidos em micro e macroalgas em ratos espontaneamente hipertensos 34

DISCUSSÃO 34

CONCLUSÃO 37

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 38

CAPÍTULO II- PURIFICAÇÃO PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I DA CIANOBACTÉRIA *Arthrospira platensis* 44

RESUMO 45

INTRODUÇÃO 46

MATERIAIS E MÉTODOS 47
Materiais 47
Condições de cultura 47
Digestão Gastrointestinal (GI) In vitro 47
Purificação dos peptídeos da cianobactéria *Arthrospira platensis* 49
Atividade inibitória da ECA 49
Análises estatísticas 50

RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
Atividade de inibição da ECA das frações ultrafiltradas da cianobactéria *A. platens*is 51
Purificação dos peptídeos iECA da cianobactéria *A. platensis* 52

CONCLUSÃO 55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA 56

CAPÍTULO III- PRODUTO ANTI-HIPERTENSIVO FORMADO POR PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS OBTIDOS DA BIOMASSA DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES 58

RESUMO 59

CAPÍTULO IV- A CIANOBACTERIA *Arthrospira platensis* **COMO FONTE DE PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVOS** 61

RESUMO 62

CAPÍTULO V- *Arthrospira sp. (sin. Spirulina sp.)* **E C-FICOCIANINA COMO SUPLEMENTO NUTRACÊUTICO NEFROPROTETOR EM DOENÇAS RENAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE** 64

RESUMO 65

INTRODUÇÃO 66

MATERIAIS E MÉTODOS 69

Protocolo e diretrizes 69

Critérios de inclusão 69

Critérios de exclusão 69

Estratégia de busca 69

Dados obtidos dos estudos 69

Análise da qualidade metodológica 71

Análises estatísticas 71

RESULTADOS 72

Efeitos da suplementação com *Arthrospira (sin. Spirulina)* ou c-ficocianina na concentração de creatinina sérica (CS) 74

Efeitos da suplementação com *Arthrospira (sin. Spirulina*) ou c-ficocianina na concentração de ureia (U) 76

Efeitos da suplementação com *Arthrospira (sin. Spirulina*) ou c-ficocianina na concentração de ácido úrico (AU) 78

Efeitos da suplementação com *Arthrospira (sin. Spirulina*) ou c-ficocianina na concentração de proteinúria (PTU) 80

Efeitos da suplementação com *Arthrospira (sin. Spirulina*) ou c-ficocianina nos níveis arteriais sistólicos (mmHg) 82

DISCUSSÃO 84

CONCLUSÃO 86

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

MATERIAIS SUPLEMENTARES 90

CONSIDERAÇÕES FINAIS 98

ANEXOS 99

1. INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define como suplemento alimentar qualquer produto para ingestão oral apresentado em formas farmacêuticas contendo nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados (ANVISA, 2022). A cianobactéria *Arthrospira platensis (sin. Spirulina platensis)* tem gerado grande interesse nos setores biotecnológicos, sobretudo, aqueles destinados à saúde humana, por produzir diferentes bioativos, entre eles, peptídeos com atividade anti-hipertensiva. Peptídeos naturais bioativos da *Spirulina* são alvo de investigações para promover o tratamento ou a prevenção de doenças, através do uso farmacológico ou nutracêutico. Desde 2003, o *Food and Drung Administration* (FDA) atesta que a *Spirulina* é um "superalimento" e está na categoria dos *Generally Regarded As Safe* (GRAS) (FDA,2003). No Brasil, desde 2018, é atestado e liberado para comercialização como suplemento alimentar (ANVISA, 2022).

A hipertensão arterial é uma doença silenciosa e com etiologia variada, estando relacionada a fatores genéticos, hábitos de vida e ambientais; e ao surgimento de doenças cardiovasculares (BARROSO et al., 2021). Segundo dados recentes da *World Health Organization* (WHO), em 2021, estimou-se que 1 a cada 4 homens e 1 a cada 5 mulheres, possuem pressão sistólica acima de 140mmHg e diastólica acima de 90mmHg. Alguns tratamentos farmacológicos são utilizados na prática clínica, incluindo o uso da classe de inibidores da enzima conversora de angiotensina-I/ bloqueadores do receptor de angiotensina (BARROSO et al., 2021). Entretanto, em contexto de uso crônico desses fármacos, diversos efeitos colaterais são verificados como fraqueza, cãibras, hipovolemia, disfunção erétil, arritmias ventriculares, edema maleolar, cefaleia latejante, tonturas (BARROSO et al., 2021). Alternativas naturais que mitiguem os efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com uso crônico de anti-hipertensivo, são alvo desta investigação.

Pesquisas '*in vitro'* e '*in vivo'* relatam que as propriedades nutricionais da cianobactéria *A. platensis* têm sido relacionadas com possíveis efeitos terapêuticos que podem auxiliar no tratamento de problemas de saúde, incluindo a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares. Peptídeos anti-hipertensivos de microalgas e cianobactérias já foram identificados utilizando hidrolisados enzimáticos de: *Ulva rigida, Chlorella ellipsoidea, Chlorella vulgaris, Enteromorpha clathrata, Spirulina platensis, Nanno chloropsis oculata* e *Microcystis aeruginosa* (PAIVA et al., 2016; SEOK-CHUN et al., 2012; SHEIH et al., 2009; PAN et al., 2016; SAMARAKOON et al., 2013; OKINO et al., 1993).

No capítulo 1 está descrito uma revisão sistemática para verificar o potencial das algas como fonte de peptídeos iECA. Os resultados mostraram que as enzimas comerciais termolisina e bromelaína extraíram peptídeos iECA com maior atividade específica. Peptídeos curtos com aminoácidos hidrofóbicos no C-terminal e padrão de inibição não-competitivos são mais eficazes para a inibição da ECA. No capítulo 2 estão descritos resultados experimentais sobre extração e purificação de peptídeos iECA da cianobactéria *A. platensis.* A biomassa foi produzida em condição autotrófica e submetida à DGI *in vitro* em condições fisiológicas simuladas, com as enzimas pepsina e pancreatina, sequencialmente. Em seguida, o sobrenadante foi ultrafiltrado com membrana de *cut-off* de 3 e 10 kDa. A fração menor de 3kDa (AP-III) obteve maior grau de inibição de 90,43±0,89% e IC50 = 0,001 mg/mL. A fração AP-III foi submetida a purificação por sistema AKTA Superdex-G75 e SOURCE™ RPC obtendo-se seis picos (Fr-I, II, III, IV, V e VI).

O capítulo 3 refere-se a uma patente de invenção de um produto constituído por peptídeos anti-hipertensivos extraídos de microrganismos fotossintetizantes presentes na biomassa celular hidrolisada ou peptídeos purificados encapsulados em biopolímero. O Capítulo 4 consiste em um capítulo no e-Book Ciências da vida, com o título "Cianobactéria *Arthrospira platensis* como fonte de peptídeos anti-hipertensivos". Por fim, no capítulo 5 consiste em uma revisão sistemática e meta-análise a resposta nefroprotetora do uso da *Spirulina* ou C-ficocianina, em contexto de doenças renais em modelos pré-clínicos. O tratamento com *Spirulina* ou C-ficocianina apresentou uma melhora nas concentrações séricas (mg/dL) dos quatro biomarcadores de função renal analisados: creatinina, ácido úrico, ureia. Para proteinúria, não observamos melhora significativa. Também houve diminuição dos níveis sistólicos em contexto de hipertensão arterial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Arthrospira platensis (sin. Spirulina platensis)*

2.2.1 Taxonomia

Os gêneros *Arthrospira* e *Spirulina* ainda são comumente associados como sinônimos na literatura científica, entretanto, diversos autores (DESIKACHARY, 1959; RIPPKA et al., 1981; ANAGNOSTIDIS E KOMAREK, 1988) apontam para a separação em dois gêneros distintos com base nas características entre os tamanhos das hélices e tricomas (DESIKACHARY, 1959; HINDAK, 1985), motilidade e fragmentação dos tricomas, estrutura da parede celular e padrão dos poros e tilacóides (GUGLIELMI e COHEN-BAZIRE, 1982A, 1982B; ANAGNOSTIDIS e KOMAREK, 1988), presença de vesículas de gás (GUGLIELMI et al., 1993) e sequência de oligonucleotídeos do 16S rRNA (GUGLIELMI et al., 1993; GIOVANNONI et al., 1988; WATERBURY, 1992). Através destas análises, a distinção entre gêneros foi oficialmente aceita pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriologia* (CASTENHOLZ, 1989).

A importância em reconhecer a *Arthrospira* como um gênero distinto da *Spirulina* também surge da necessidade de evitar a confusão entre espécies que ainda não são consideradas para fins nutricionais, já que a *Arthrospira* é tradicionalmente utilizada para o consumo humano. Entretanto, pela dificuldade em separar os dois gêneros pelos autores nos estudos avaliados ao longo desta pesquisa, como também o setor industrial de alimentos nomear como *Spirulina*, foi adotado, neste estudo, a denominação de *Arthrospira* como sinônimo de *Spirulina.*

2.2.2 Habitat, morfologia, composição bioquímica e formas de cultivo

A *Spirulina (sin. Arthrospira)* é uma cianobactéria filamentosa verde-azulada, fotossintética e autotrófica, simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, multicelular com tricomas cilíndricos e hélices abertas para o lado esquerdo durante todo seu comprimento. Os tricomas helicoidais medem cerca de 50 a 500 mm de largura e 3 a 4 mm de altura, e são envoltos por uma fina bainha que mostram constrições pronunciadas ao longo das paredes transversais (Figura 1). São facilmente digeridas por enzimas por apresentarem superfície celular lisas e sem parede celular. Os principais pigmentos são a

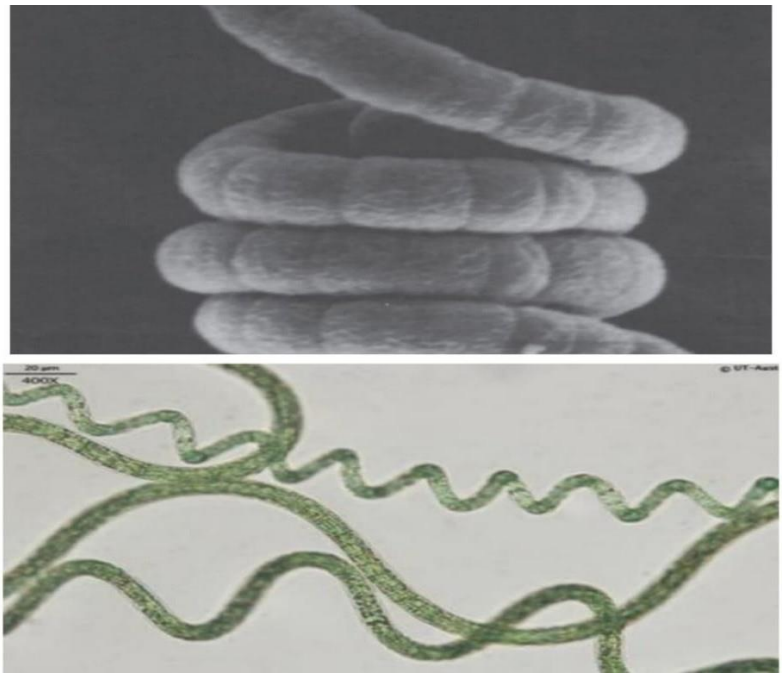
ficocianina que fornece a cor azul a célula, clorofila e carotenoides, e algumas espécies possuem ficoeritrina que apresenta cor rosa/avermelhada (CAPELLI and CYSEWSKI, 2010; HABIB et al., 2008; ALI and SALEH, 2002; VO et al., 2015).

A *S. platensis* é uma espécie mais amplamente distribuída, principalmente no continente Africano, na Ásia e América do Sul. A *S. maxima* (sin. *S. geitleri*) está concentrada na América Central. Esta última espécie representa a principal componente do fitoplâncton do Lago Texcoco (Vale mexicano), que poderia ser considerado como o habitat original desta espécie (BUSSON, 1971; CLÉMENT, 1975; DURAND-CHASTEL, 1980; GUÉRIN-DUMARTRAIT e MOYSE, 1976). Do mesmo modo, os lagos salinos alcalinos do semideserto a zona Sudão-Sahel, com epicentro no Lago Chade, e as do Vale do Rift, dominaram por *S. platensis*, e podem ser considerados os pontos iniciais de habitat desta espécie (ILTIS, 1970, 1971, 1980; RICH, 1931, 1933; LÉONARD e COMPÈRE, 1967; MARTY e BUSSON, 1970; CLÉMENT, 1971, 1975; GUÉRIN-DUMARTRAIT e MOYSE, 1976). As cianobactérias *Arthrospira platensis* sobrevivem em pH alcalino elevado (8,5 a 11), e são altamente adaptáveis em diversos habitats como solo, pântanos, água doce, água salobra, água do mar e ambientes termais. Por ser um microrganismo fotoautotrófico obrigatório, a *Spirulina (sin. Arthrospira)* não consegue crescer em ambientes com baixa ou nenhuma luminosidade. O principal produto fotossintético para assimilação é o glicogênio e a taxa de crescimento ótimo ocorre em temperaturas entre 35 e 39°C (RICHMOND, 1986; VO et al., 2015).

Apresenta uma composição rica em diversas macromoléculas bioativas como proteínas, aminoácidos essenciais, clorofilas, carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, vitaminas, minerais, fibras e fitonutrientes (KAY, 1991; PASQUET et al., 2011; VO et al, 2015). A concentração proteica pode chegar a 70% do seu peso seco, com aminoácidos essenciais presentes como leucina, isoleucina, valina, metionina, valina e lisina. Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa podem chegar à concentração de 6% do total lipídico (LI and QI, 1997; VO et al., 2015). Vitaminas do complexo B e as E, K, D, C também estão presentes.

Além disso, todos os minerais (potássio, cálcio, crómio, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selénio, sódio e zinco) e pigmentos como a clorofila a, xantofila, betacaroteno, echinenone, mioxantofila, zeaxantina, cantaxantina, diatoxantina, 3-hidroxiechinenone, betacriptoxantina, oscilaxantina, c-ficocianina e aloficocianina. Também estão presentes carboidratos compostos principalmente de glicose, juntamente com ramnose, manose, xilose, galactose, e dois açúcares incomuns, incluindo 2-O-metil-L-ramnose e 3-O-metil-Lramnose (HABIB et al., 2008; KORU, 2009; VO et al., 2015).

Figura 1. (a) Microscopia eletrônica de varredura da *Spirulina platensis* com parte do tricoma helicoidal em espiral contínuo, (b) foto microscópica da *Spirulina platensis* ampliada em 400x. Fontes: TOMASELLI (1997) e UNIVERSIDADE DO TEXAS (UTEX, 2022).



As cianobactérias podem ser cultivadas em sistemas abertos, exterior ou outdoor (lagoas, tanques), sistemas fechados, interior ou indoor (cilindros verticais, os painéis verticais ou horizontais de forma achatada (flat panel) e os fotobiorreatores tubulares (serpentinas verticais ou horizontais), construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato) ou sistemas mistos ou híbridos (etapas que variam entre sistema aberto e fechado). Alguns parâmetros de produtividade devem ser considerados para a escolha do tipo de sistema de cultivo como a unidade de volume do reator ($g.L^{-1}$ dia^{-1}), produtividade por unidade de superfície ocupada pelo reator ($g\ m^2\ dia^{-1}$) e produtividade por unidade de superfície iluminada do reator ($g.m^2\ dia^{-1}$) (RICHMOND, 2004). As variáveis temperatura, pH, disponibilidade de dióxido de carbono e gás oxigênio, também devem ser verificadas para a produção de biomassa de cianobactérias. A *Arthrospira platensis* demonstrou melhor produtividade quando cultivada em sistema misto utilizando um dispositivo em painel alveolar integrado a uma lagoa aberta, mantendo o controle da temperatura em faixa ótima para o crescimento celular. Foi verificado uma produtividade total aumentada (g^{-1} dia^{-1}) em cerca de 15% em comparação aos sistemas de tanque e painéis operados isoladamente (PUSHPARAJ et al., 1997).

2.2.3 Uso da *Spirulina* como suplemento alimentar

Os primeiros relatos históricos apontando para o uso da *Spirulina* como alimento surgiram desde 1519 na civilização asteca no México, onde era colhida no lago Texcoco, seca e comercializada como alimento em mercado típico da região. No ano de 2022, após decreto presidencial, o lago Texcoco adquiriu status de área natural protegida (SANCHEZ et al., 2003; VO et al., 2015; DOF, 2022). Na República do Chade, na tribo Kanembu,era utilizada como pão seco. Por ser um alimento rico nutricionalmente, a Organização das Nações Unidas (ONU) reconheceu a *Spirulina* como o "alimento do futuro", já sendo cultivada em diversos países do mundo (FOX, 1996; BELAY, 2002; VO et al., 2015). A *Spirulina* comercial pode ser produzida em lagoas abertas em condições controladas, e estima-se uma produção anual mundial de mais de 50 toneladas, sendo a China a principal produtora (FAO, 2008).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a categoria de Suplemento alimentar foi criada em 2018, no Brasil, com o intuito de garantir o acesso da população a produtos seguros e de qualidade, fornecendo nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos em complemento à alimentação. Os constituintes autorizados para uso na composição de suplementos alimentares restringem-se àqueles previstos na Instrução Normativa nº 28/2018 e são listados conforme fontes de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas. No caso da *Spirulina*, o ingrediente é autorizado como fonte de proteínas, devendo atender obrigatoriamente o mínimo de 8.4g de proteínas para adultos (ANVISA, 2020).

A *Spirulina* é utilizada com suplemento alimentar para humanos e animais, aprovada pela FDA com o status de *Generally Regarded As Safe* (GRAS) desde 2003 (FDA, 2003). A literatura médico-científica descreve inúmeras propriedades terapêuticas associadas à compostos presentes na *Spirulina (sin. Arthrospira)*, com ação contra hiperlipidemia (PONCE-CANCHIHUAMÁN et al., 2010), antineoplásica (HAQUE and GILANI, 2005), efeitos no sistema imune (SUDHA et al., 2011), proteção contra radiação (HIRAHASHI et al., 2002), nefrotoxicidade (SHARMA et al., 2012), diabetes (MANI et al., 2000), obesidade (DINIZ et al., 2021), hipertensão (MACHOWIEC et al., 2021), anti-viral (AYEHUNIE et al., 1998), anti-inflamatório (KIM et al., 1998) e antioxidante (PARK et al., 2018). Desta forma, é possível sugerir, para além do fornecimento de nutrientes, a presença de substâncias bioativas que potencialmente agregam valor terapêutico a biomassa da *Spirulina*.

2.2.4 Algas e cianobactérias como fonte de peptídeos anti-hipertensivos

Diversos estudos pré-clínicos apontam para o potencial de espécies tanto de macroalgas quanto microalgas e cianobactérias como fonte de peptídeos anti-hipertensivos. As macroalgas *Ulva rigida, Ulva compressa, Gelidium microdon e Pterocladiella capilácea, Gracilariopsis lemaneiformis e Fucus spiralis* demonstraram que peptídeos iECA purificados possuem alta atividade específica (PAIVA et al., 2016; CAO et al., 2017). Métodos enzimáticos para obtenção de proteínas/peptídeos bioativos são amplamente investigados. Enzimas comerciais (alfa-amilase, celulase e peptidase) foram utilizadas para realizar a hidrólise enzimática da biomassa de macroalgas *Macrocystis pyrifera e Chondracanthus chamissoi*, entretanto, não produziram peptídeos com efeito hipotensor pela inibição da ECA (VÁSQUEZ et al., 2019).

Diferentes enzimas comerciais são utilizadas isoladamente ou em sequência para se obter peptídeos iECA. Uma investigação consistiu em utilizar separadamente as enzimas tripsina, pepsina, papaína, alcalase, neutrase e flavorzima em hidrólise da biomassa de *Arthrospira platensis* em condições de pH e temperatura controladas. A etapa com pepsina em pH= 2,0 a 37°C proporcionou melhor atividade específica com o peptídeo iECA de sequência Pro-Thr-Gly-Asn-ProLeu-Ser-Pro e IC50= 1,54 mg/mL (WANG et al., 2021). Suetsuna & Chen, (2001) também utilizaram a pepsina para a hidrólise da biomassa de *Arthrospira platensis* e obtiveram os peptídeos iECA de sequência Ile-Ala-Glu, Phe-Ala-Leu, Ala-Glu-Leu, Ile-Ala-Pro-Gly e Val-Ala-Phe, em que a sequência Ile-Ala-Pro-Gly exibiu melhor atividade iECA com IC50=11,4 μM.

As enzimas pepsina, alcalase, papaína, flavourzima, protamex, kojizime, neutrase, tripsina, α-quimiotripsina foram utilizadas isoladas ou sequencialmente para hidrolisar a biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* (CHUAN SHEIH et al, 2009) e *Chlorella ellipsoidea* (SEOK-CHUNKO, 2012 e KR101404850B1) e produziram peptídeos inibidores da ECA. Nos documentos WO2019229288A1 e JP2007297328A peptídeos iECA foram identificados a partir da cianobactéria *Arthrospira platensis* e *Spirulina sp*. Métodos físicos também são empregados para se obter peptídeos iECA, como foi relatado por Lun et al. e as patentes CN101906135A e CN101768209A à extração de peptídeos inibidores da ECA de *Spirulina platensis* da biomassa por sonicação associado a métodos de congelamento/descongelamento criogênico (LUN et al., 2010).

A simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal (DGI) pode ser um método para verificação da estabilidade, resistência e absorção dos bioativos investigados. Por ser mais rápido, sem restrições éticas e possibilidade de testagem de um volume considerável de amostras, torna-se uma triagem de avaliação que precede etapas futuras de investigações clínicas. Wang et al. (2021), submeteram o

peptídeo iECA de sequência Pro-Thr-GlyAsn-Pro-Leu-Ser-Pro a etapa de simulação *in vitro* da DGI e não houve perda de atividade específica. Yücetepe et al. (2018) avaliaram os efeitos da hidrólise e da DGI na atividade oxidante e iECA da *Spirulina platensis* utilizando as enzimas pepsina, tripsina e pancreatina em condições fisiológicas simuladas *in vitro*, e não verificaram perdas significativas para ambas as atividades específicas (YÜCETEPE et al., 2018).

2.3 HIPERTENSÃO ARTERIAL (HA)

2.3.1 Definição e aspectos epidemiológicos

A pressão arterial (PA) é resultante da relação da hemodinâmica entre o volume cardíaco por minuto e a resistência do sistema vascular. Alterações no equilíbrio entre essas duas variáveis, desencadeia um aumento da pressão arterial, podendo levar a um quadro patológico (BASSO, 2010). É considerado hipertensão arterial com PA sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg (BARROSO et al., 2020). Por, na maioria das vezes, não apresentar sintomas, a HA pode evoluir para danos estruturais e funcionais em órgãos como o coração, rins, cérebro e vasos, estando relacionada com o surgimento de doenças cardiovasculares, doença crônica renal e isquemias cerebrovasculares (BARROSO et al., 2020).

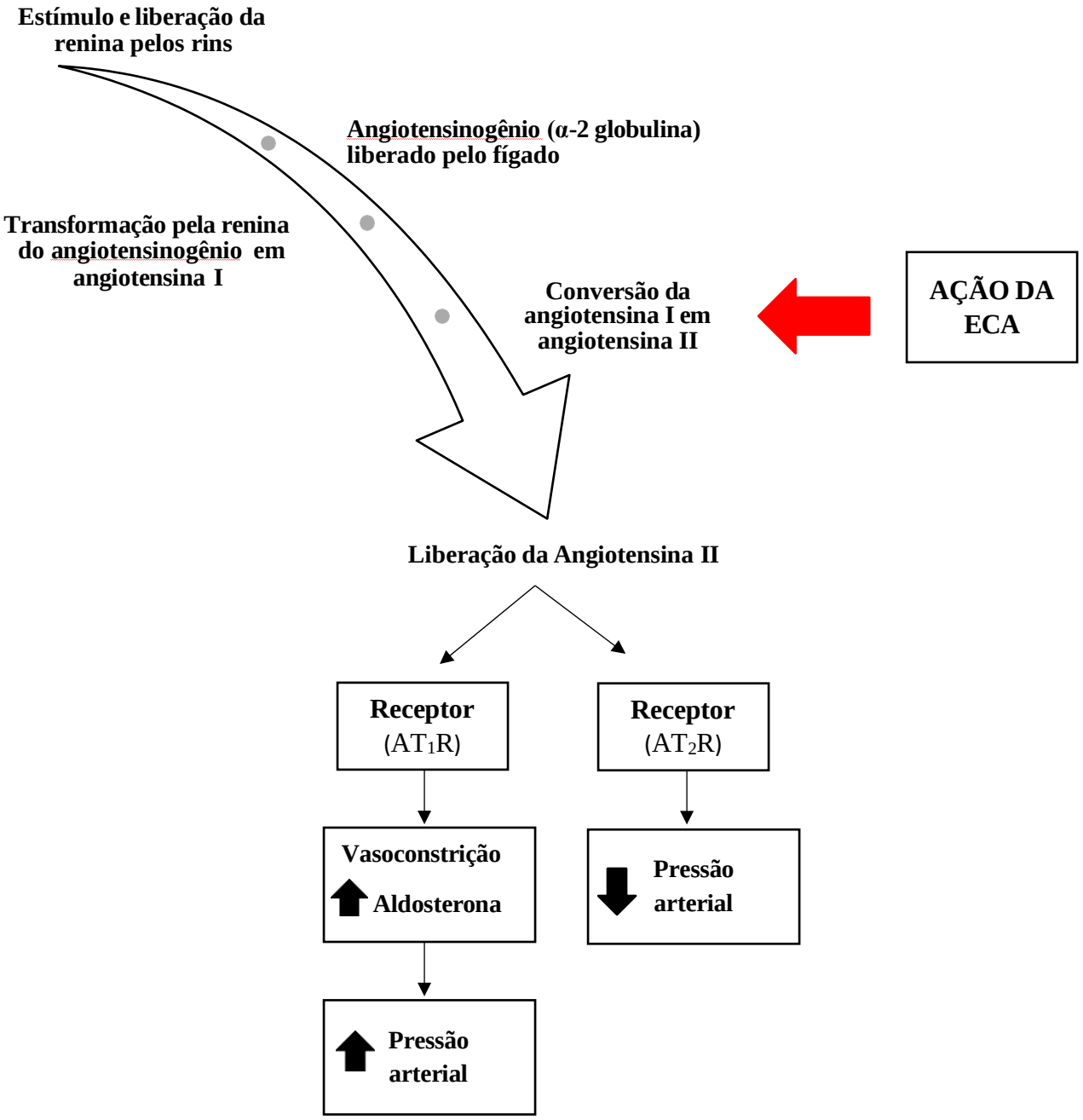
Os fatores de risco para o surgimento da HA estão relacionados a genética (fatores genéticos influenciam os valores de PA cerca de 30-50%), idade, sexo, etnia, sobrepeso/obesidade, ingestão de sódio e potássio, sedentarismo, álcool, uso de drogas e fatores socioeconômicos (BARROSO et al, 2020). O número de adultos com idade entre 30 e 79 anos com HA passou de 650 milhões para 1.13 bilhão nos últimos 30 anos, segundo análise global da prevalência, detecção, tratamento e controle, liderado por *Imperial College London* e *World Health Organization* (WHO). Estima-se que 1 a cada 4 homens e 1 a cada 5 mulheres, possuem HA. (LANCET et al., 2017; WHO, 2021). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional em Saúde em 2013, 21,4% (IC 95% 20,8-22,0) dos adultos brasileiros relataram possuir HA. Já quanto ao uso me medicamentos anti-hipertensivos e medição de PA, o percentual de adultos com HA passou a ser 32.3% (IC 95% 31,7-33,0). Em indivíduos idosos, o percentual aumentou para 71,7% (MALTA et al., 2018).

2.3.2 Fisiopatologia da HA e Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

A fisiopatologia da HA se relaciona com os mecanismos de controle da pressão arterial normal e avaliação das leves alterações que precedem o aumento dos níveis pressóricos arteriais. Podem ser de origem do sistema nervoso autônomo que envolve processos multifatoriais (anormalidades neurológicas, circulatórias, renais e metabólicas) que participam no desenvolvimento ou manutenção da HA, do complexo sistema enzimático renina-angiotensina-aldosterona que atua na homeostase dos níveis pressóricos através da ação sistêmica do octapeptídeo angiotensina-II ou através das espécies reativas de oxigênio (EROs) que em níveis alterados levam a disfunção renal e dano vascular (BASSO, 2010; REDON et al., 2003).

O SRA é um complexo sistema enzimático responsável pela regulação da pressão arterial (PA) e homeostase eletrolítica. Em situação de hipotensão arterial renal, diminuição das concentrações de Na+ nos túbulos distais captadas pela mácula densa e/ou ativação da resposta nervosa simpática, as células justaglomerulares do rim liberam a enzima renina, responsável pela clivagem na extremidade aminoterminal da proteína hepática circulante chamada angiotensinogênio (AGT) em angiotensina-I (ANG-I), um decapeptídeo inativo. A enzima conversora de angiotensina (ECA), por sua vez, cliva a ANG-I, removendo o dipeptídeo carboxiterminal, produzindo ANG-II, um octapeptídeo altamente ativo e responsável pelas respostas fisiológicas na pressão sanguínea. A ANG-II atua por meio de dois receptores principais: receptor de angiotensina tipo 1 (AT_1R) que produz efeitos de vasoconstrição, anti-diurese, liberação de vasopressina e aldosterona, estímulo a fibrose e proliferação celular. Já o receptor de angiotensina do tipo 2 (AT_2R) é uma via alternativa de controle e proteção de órgãos que influencia na remodelação vascular, na prevenção da aterosclerose e na diminuição da pressão sanguínea (quando associada a um inibidor do AT1R) (CHAPPELL MC, 2016; GRÖNHAGEN-RISKA and FYHRQUIST., 1980; GUANG et al., 2012; GASPARO et al., 2000; SIRAGY et al., 2000) (**Figura 2**).

Figura 2. Etapas do mecanismo de ação do Sistema Renina Angiotensina na Hipertensão Arterial.

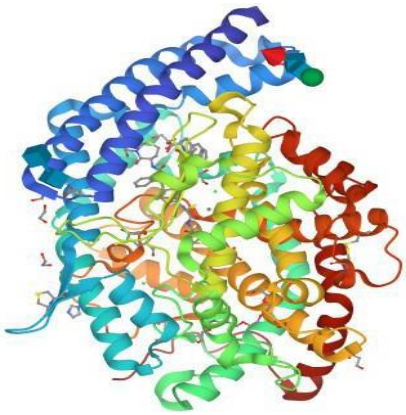


Adaptado: Autora (2022).

2.3.3 Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase I com dois domínios homólogos ativos amino e carboxi-terminal, pertencendo ao grupo das metaloproteases com ligantes sendo o Zn ($^{2+}$) e Cl^{-}. O Zn ($^{2+}$) liga-se com 2 íons por subunidade da enzima e o Cl^{-} com 3 íons por subunidade, sendo o Cl^{-} capaz de produzir uma alta ativação enzimática. Possui valor de K_m de 2.51 e como um dos substratos o hipuril histidil leucina (HHL). É expresso em níveis mais elevados no pulmão, rim, coração, sistema gastrointestinal e próstata. A ECA tem a função de converter a angiotensina I em angiotensina II pela da liberação do dipeptídeo C-terminal His-Leu da ANG-1, o que resulta em aumento da atividade vasoconstritora através da ANG-II. Em C-terminais com Pro, Asp e Glu a ECA tem pouca ou nenhuma ação catalítica. Também é capaz de inativar bradicinina, um potente vasodilatador. Além disso, exerce atividade de glicosidase que libera proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI) da membrana, clivando a ligação da manose da GPI. Provavelmente a atividade da glicosidade ocorre com resíduos ativos diferentes da atividade da metaloprotease. Os inibidores da ECA são comumente utilizados para o tratamento da hipertensão e alguns tipos de disfunções renais e cardíacas (UNIPROT, 2018; COZIER et al. 2018) (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura cristalina em 3D da enzima conversora de angiotensina humana-1 em complexo com o inibidor omapatrilato.



Fonte: COZIER et al. (2018).

2.3.4 Abordagens terapêuticas atuais: inibidores da ECA

Segundo as diretrizes da *World Health Organization* (WHO) que recomenda protocolos para o tratamento da Hipertensão arterial em adultos, inicia-se a intervenção farmacológica em indivíduos com diagnóstico confirmado para HA e pressão sistólica igual ou acima de 140mmHg e diastólica para igual ou acima de 90mmHg, e em caso de existência de doença cardiovascular, níveis sistólicos entre 130 e 139 mmHg. As classes farmacológicas recomendadas englobam: 1) agentes tiazídicos ou semelhantes, 2) inibidores da angiotensina-II/ bloqueadores do receptor de angiotensina e 3) bloqueadores de canais de cálcio dihidropiridina de ação prolongada (MAKKI-AL ET AL., 2022).

Os inibidores da ECA (iECA) são altamente seletivos por não interagirem com nenhum outro componente do SRA, e sua ação consiste em atenuar ou anular a resposta da ANG-1 (relativamente inativa), o que não ocorre com a ANG-II (altamente ativa). Por possuir variados substratos de acordo com o local de ação, a ECA pode estar relacionada a indução de efeitos colaterais não associadas à ANG-II. Os iECAs atuam aumentando os níveis de bradicinina (vasodilatador) e como consequência, o estímulo a biossíntese de prostaglandina, ambos relacionados ao efeito farmacológico do fármaco (Goodman et al., 2005). Segundo a revisão conduzida por Heran et al. (2008) com 12.954 participantes durante 6 semanas, a avaliação do quanto essa classe de anti-hipertensivo incluindo o ramipril (marca: Altace), captopril (Capoten), enalopril (Vasotec), fosinopril (Monopril), lisinopril (Prinivil, Zestril) e quinapril (Accupril), reduz a pressão arterial e se existe diferenças entre as drogas específicas entre si, não demonstrou diferença hipotensora clinicamente significativa entre os diferentes iECAs; o efeito na redução da PA é modesto e a magnitude com ½ dose máxima recomendada ou mais é de -8/-5mmHg (HERAN et al., 2008).

Alguns efeitos colaterais estão associados ao uso de iECA em pacientes hipertensos crônicos, como fraqueza, cãibras, hipovolemia, disfunção erétil, arritmias ventriculares, edema maleolar, cefaleia latejante, tonturas, rubor facial, tosse seca, piora de função renal e hiperpotassemia (BARROSO et al., 2020). A agência regulatória norte-americana, *Food and Drug Administration* (FDA), apontou que o uso de iECA durante o primeiro trimestre de gravidez, aumenta consideravelmente o risco de malformação fetal congênita, o que inclui: oligohidrâmnio, retardamento do crescimento intra-uterino, displasia renal, anúria, insuficiência renal e morte, quando comparados com bebês não expostos ao medicamento durante a mesma fase gestacional (COOPER et al., 2006).

2.3.5 Hipertensão Arterial e COVID-19

A COVID-19 é a doença causada por um novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, responsável pelo quadro patológico de síndrome respiratória aguda grave em humanos. Foi anunciada pela primeira vez em 31 dezembro de 2019, na capital Wuhan, província de Hubei na China, e rapidamente culminou em uma grave crise em saúde a nível global. O vírus SARS-CoV-2 pertence ao subgênero *Sarbecovírus* e família *Coronaviridae*, sendo o 7º coronavírus identificado como agente infeccioso humano (OMS, 2021).

O SARS-Cov-2 utiliza uma glicoproteína de membrana, chamada *spike*, como mecanismo infeccioso celular. Alguns receptores de membrana em células humanas já foram identificados, e servem como "porta" de entrada para a patogênese do coronavirus, incluindo: serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) (MATSUYAMA, S. et al., 2020; SUNGNAK et al., 2020), receptores de ácido siálico (TORTORICI et al., 2019; HULSWIT, R. et al., 2019), indutor de metaloproteinase de matriz extracelular (CD147, também conhecido como basigina) (CHEN, Z.; et al., 2005) e catepsina B e L (OU, X. et al., 2020). Além disso, o receptor da enzima conversora de angiotensina-2 (rECA_2) demonstrou ser um co-receptor do SARS-Cov-2. Levando em consideração a presença dos rECA_2 em diversos tecidos no corpo humano (rins, células do endotélio, miocárdio, mucosa gastrointestinal, pulmões, por exemplo), quanto maior densidade de receptores da ECA_2 em um determinado tecido, maior a gravidade do desenvolvimento da COVID-19 (LETKO, M. et al., 2020; WANG, Q. et al., 2020; GUZZI, P.H. et al., 2020).

Com isso, há uma enorme preocupação quanto ao tratamento anti-hipertensivo, principalmente com a abordagem utilizando vias presentes no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (inibição da ECA ou bloqueadores do receptor de angiotensina-II) pela contribuição no aumento de efeitos colaterais que estimulem o agravamento no quadro clínico da doença (GHEBLAWI, M. et al., 2020; SOMMERSTEIN, R. et al., 2020; DANSER, A.J. et al., 2020). Diante disso, torna-se um desafio médico-científico a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação receptores ECA_2 e SARS-Cov-2, como também a avaliação do tratamento anti-hipertensivo utilizando as vias de IECA/BRA, como fatores negativos ao prognóstico de pacientes hipertensos com COVID-19.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-BAKY, H. H.; EL BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. American-Eurasian Journal of Scientific Research, v. 2, n. 2, p. 170-179, 2007.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde da microalga Spirulina. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 29, n. 2, p. 115-123, 2008.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA): suplementos alimentares.[*s.l.*],29jul.2022.disponívelem:http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/suplementos+alimentares/a6fd2839-6d80-496a-becb-8b2122eff409. acesso em: 11 ago. 2022.

BARREIRO, ELIEZER J.; FERREIRA, VITOR. F. AND COSTA, PAULO R. R. Pure enantiomeric substances: the question of chiral drugs. Quím. Nova [online]. 1997, vol.20, n.6, pp.647-656. ISSN 01004042. http://dx.doi.org/10.1590/S0100- 40421997000600014.

BARROSO et al. Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial – 2020. Arq Bras. Cardiol., v. 116, n. 3. P. 516-658, mar. 2021.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. Plant Cell Physiol., 1991, 32, 953.

BUSSON, F. (1971) *Spirulina platensis* (gom.) geitler et spirulina geitleri j.de toni, cyanophycées alimentaires, service de santé, marseille.

CHEN, Z.; MI, L.; XU, J.; YU, J.; WANG, X.; JIANG, J.; XING, J.; SHANG, P.; QIAN, A.; LI, Y.; et al. Function of hab18g/cd147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. j. infect. dis. 2005, 191, 755–760.

CHEUNG, H.S.; CUSHMAN, D.W. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of Bothrops jararaca. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, [s. l.], 15 fev. 1973. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0005274473903525. Acesso em: 13 out. 2019.

CHU, W.-L.; LIM, Y.-W; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.-E. Protective effect of aqueous extract from Spirulina platensis against cell death induced by free radicals. BCM Complementary and Alternative Medicine, v. 10, n. 53, p.1472- 6882, 2010.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. fatty acids profile of spirulina platensis grown under different temperatures and nitrogen concentrations. z. naturforsch, n. 59, 55-59, 2004.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology, n. 98, p. 1489–1493, 2007

COOPER.W.O, HERNANDEZ-DIAZ S., ARBOGAST P. G., DUDLEY J. A., DYER S., GIDEON P. S., HALL K., RAY W. a. major congenital malformations after first-trimester exposure to ace inhibitors. n engl j med 354:2443-2451, jun 8, 2006.

COZIER, GE; ARENDSE, LB; SCHWAGER, SL; STURROCK, ED; ACHARYA, KR mole cular basis for multiple omapatrilat binding sites within the ace c-domain: implications for drug design. j med chem61:10141-10154 (2018).

DANSER, A.J.; EPSTEIN, M.; BATLLE, D. Renin-angiotensin system blockers and the covid-19 pandemic: at present there is no evidence to abandon renin-angiotensin system blockers. hypertension 2020, 12015082.

DINIZ, A. F. A., DE OLIVEIRA CLAUDINO, B. F., DUVIRGENS, M. V., DA SILVA SOUZA, P. P., FERREIRA, P. B., JÚNIOR, F. F. L., ... & DA SILVA, B. A. (2021). spirulina platensis consumption prevents obesity and improves the deleterious effects on intestinal reactivity in rats fed a hypercaloric diet. oxidative medicine and cellular longevity, 2021.

DOF (DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN): área de protección de recursos naturales, la zona conocida como lago de texcoco. [*s. l.*], 22 mar. 2022. disponível em: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5646249&fecha=22/03/2022#gsc.tab=0. acesso em: 11 ago. 2022.

DURAND-CHASTEL, H. (1980) Production and use of Spirulina in Mexico. in shelef, g. and soeder, c.j. (eds), algae biomass, p. 39, amsterdam: elsevier/north-holland biomedical press.

ESTRADA, J. E. P.; BESCOS, P. B.; FRESNO, A. M. V. DEL. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. Il Farmaco, n. 56, p. 497-500, 2001.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. agency response letter gras notice no. grn 000127 cfsan/office of food additive safety. 2003. disponível em http://www.fda.gov/food/foodingredientspackaging/generallyrecognizedassafegras/graslistings/ucm153944.html.

GHEBLAWI, M.; WANG, K.; VIVEIROS, A.; NGUYEN, Q.; ZHONG, J.; TURNER, A.T.; RAIZADA, M.K.; GRANT, M.B.; OUDIT, G.Y. Angiotensin converting enzyme 2: sars-cov-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system. Circ. Res. 2020, 126.

GUÉRIN-DUMARTRAIT, E. AND MOYSE A. (1976) Charactéristiques biologiques des spirulines, ann. nutr. alim., 30, 489.

GUZZI, P.H.; MERCATELLI, D.; CERAOLO, C.; GIORGI, F.M. Master regulator analysis of the sars-cov-2/human interactome. j. clin. med. 2020, 9, 982.

HENRIKSON, R. Microalga Spirulina superalimento del futuro. 1a Edição. Barcelona: Ediciones Urano, 1994, 222 p.

HERRERO, M.; ÁLVAREZ, P. J. M.; SENORANS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from Spirulina platensis microalga. Food Chemistry, n. 93, p. 417–423, 2005.

HULSWIT, R.; LANG, Y.; BAKKERS, M.J.G.; LI, W.; LI, Z.; SCHOUTEN, A.; OPHORST, B.; VAN KUPPEVELD, F.J.M.; BOONS, G.-J.; BOSCH, B.-J.; et al. Human coronaviruses oc43 and

hku1 bind to 9-o-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain a. proc. natl. acad. sci. usa 2019, 116, 2681–2690.

ILTIS, A. (1970) Phytoplancton des eaux natronées du kanem (tchad). iv. note sur les espèces du genre oscillatoria, sous-genre *spirulina (cyanophyta*), cah. o.r.s.t.o.m., sér. hydrobiol., 4, 129.

ILTIS, A. (1971) Note sur oscillatoria (sous-genre spirulina) platensis (nordst.) bourrelly (cyanophyta) au tchad, cah. o.r.s.t.o.m., sér. hydrobiol., 5, 53.

ILTIS, A. (1980) Ecologie de spirulina platensis dans les milieux natronés d'afrique sahélienne. in materassi, r. (ed.) prospettive della coltura di spirulina in italia, p. 41, roma: cnr.

J. C. PONCE-CANCHIHUAMÁN, O. PÉREZ-MÉNDEZ, R. HERNÁNDEZMUÑOZ, P. V. TORRES-DURÁN, AND M. A. JUÁREZ-OROPEZA, "protective effects of spirulina maxima on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney," lipids in health and disease, vol. 9, pp. 116-117, 2010.

KAY, R.A., 1991. microalgae as food and supplement. crit. rev. food sci. nutr. 30, 555e573.

LI, D.M., QI, Y.Z., 1997. spirulina industry in china: present status and prospects. j. appl. phycol. 9, 25e28.

MACHOWIEC, P., RĘKA, G., MAKSYMOWICZ, M., PIECEWICZ-SZCZĘSNA, H., & SMOLEŃ, A. (2021). Effect of *Spirulina* supplementation on systolic and diastolic blood pressure: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. nutrients, 13(9), 3054.

MARTY, F. AND BUSSON, F. (1970) données cytologiques et systématiques sur spirulina platensis (gom.) geitl. et spirulina geitleri j.de toni (cyanophyceae-oscillatoriaceae), c.r.acad. sc. paris, 270, 786.

MATSUYAMA, S.; NAO, N.; SHIRATO, K.; KAWASE, M.; SAITO, S.; TAKAYAMA, I.; NAGATA, N.; SEKIZUKA, T.; KATOH, H.; KATO, F.; Et al. Enhanced isolation of sars-cov-2 by tmprss2-expressing cells. proc. natl. acad. sci. usa 2020, 117, 7001–7003.

MORIST, A. et al. Process Biochemistry, 2011, 37, 535 Oliveira, Solange Glória De. Caracterização dos pacientes hipertensos e diabéticos atendidos em serviço de urgência e emergência no município de Dourados-MS. 2010. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2010.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE): folha informativa sobre covid-19. [*s. l.*], 13 maio 2021. disponível em: https://www.paho.org/pt/covid19. acesso em: 11 ago. 2022.

OU, X.; LIU, Y.; LEI, X.; LI, P.; MI, D.; REN, L.; GUO, L.; GUO, R.; CHEN, T.; HU, J.; et al. characterization of spike glycoprotein of sars-cov-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with sars-cov. nat. commun. 2020, 11, 1620.

PAIVA, L.; LIMA, E.; NETO, A.I.; BAPTISTA, J. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Fucus spiralis* macroalgae and influence of the extracts storage temperature—A short report. J. Pharm. Biomed. Anal., 2016. Disponívelem: Acesso em 15 de agosto de 2016.

PASQUET, V., CHEROUVRIER, J.R., FARHAT, F., THIERY, V., PIOT, J.M., BERARD, J.B., KAAS, R., SERIVE, B., PATRICE, T., CADORET, J.P., PICOT, L., 2011. study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave-assisted extraction. process. biochem. 46, 59e67.

PINTO YM, PAUL M, GANTEN D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. Cardiovasc Res. 1998; 39(1): 77-88.

PUSHPARAJ, B., PELOSI, E., TREDICI, M., PINZANI, E., MATERASSI, R., 1997. an integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. j. appl. phycol. 9, 113e119.

RICH, F., 1931. notes on *Arthrospira platensis*, rev. algol., 6, 75.

RICH, F., 1933. Scientific results of the cambridge expedition to the east african lakes (1930–1–7): the algae, j. limnol. soc. zool., 38, 249.

RICHMOND, A., 2004. handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. blackwell science ltd.

ROCHA, H.A.O.; ALVES, L.G.; LEITE, E.L. Aproveitamento Integral De Algas Marinhas. In: Alex Augusto Gonçalves (Org.). Tecnologia Do Pescado – Ciência, Tecnologia, Inovação E Legislação. 1 Ed. São Paulo, Atheneu, 2011.

S. AYEHUNIE, A. BELAY, T. W. BABA, AND R. M. RUPRECHT, "inhibition of hiv-1 replication by an aqueous extract of spirulina platensis (arthrospira platensis)," journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology, vol. 18, no. 1, pp. 7–12, 1998.

S. E. HAQUE AND K. M. GILANI, "effect of ambroxol, spirulina and vitamin-e in naphtalene induced cataract in female rats," indian j. physiol. pharmacol., vol. 49, no. 1, pp. 57-64, 2005.

S. S. SUDHA, R. KARTHIC, AND N. J. rengaramanujam, "anti hyperlipidemic activity of spirulina platensis in triton x-100 induced hyperlipidemic rats," hygeia. J. d. med., vol. 3, no. 2, pp. 32-37, october 2011.

SAMARAKOON, K.W.; O-NAM, K.; KO, J.Y.; et al. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. Journal of Applied Phycology, v. 25, nº 5, p. 1595-1606, 2013.

SEO-HYEON, S.; IN-HYE, K.; TAEK-JEONG, N. Effect of a hot water extract of Chlorella vulgaris on proliferation of IEC-6 cells. International Journal Of Molecular Medicine, v. 29, p. 741-746, 2012.

SHEIH I.; FANG, T.; TUNG-KUNG W. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. Food Chemistry, v. 115, p. 279–284, Sociedade Brasileira De Cardiologia. Departamento de Hipertensão Arterial. VI Diretrizes Brasileiras De Hipertensão. Ver brashipertens. 2010;17(1):4-62.

SOMMERSTEIN, R.; KOCHEN, M.M.; MESSERLI, F.H.; GRANI, C. Coronavirus disease 2019 (covid-19): do angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers have a biphasic effect? j. am. heart assoc. 2020, 9, e016509.

SUNGNAK, W.; HUANG, N.; BECAVIN, C.; BERG, M.; QUEEN, R.; LITVINUKOVA, M.; TALAVERA-LOPEZ, C.; MAATZ, H.; REICHART, D.; SAMPAZIOTIS, F.; et al. Sars-cov-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. nat. med. 2020.

T. HIRAHASHI, M. MATSUMOTO, K. HAZEKI, Y. SAEKI, M. UI, AND T. SEYA, "activation of the human innate immune system by spirulina: augmentation of interferon production and nk cytotoxicity by oral administration of hot water extract of spirulina platensis," international immunopharmacology, vol. 2, pp. 423- 434, 2002.

THE UNIPROT CONSORTIUM, UNIPROT: THE UNIVERSAL PROTEIN KNOWLEDGEBASE, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, volume 46, issue 5, 16 march 2018, page 2699, https://doi.org/10.1093/nar/gky092

TORTORICI, M.A.; WALLS, A.C.; LANG, Y.; WANG, C.; LI, Z.; KOERHUIS, D.; BOONS, G.-J.; BOSCH, B.-J.; REY, F.A.; DE GROOT, R.J.; et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. nat. struct. mol. biol. 2019, 26, 481–489.

U. V. MANI, S. DESAI, AND U. IYER, "studies on the long-term effect of spirulina supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in niddm patients," ournal of nutraceuticals, functional and medical foods, vol. 2, no. 3, pp. 25–32, 2000.

V. SHARMA AND V. DUNKWAL, "development of spirulina based 'biscuits': a potential method of value addition," ethno med, vol. 6, no. 1, pp. 31-34, 2012.

VONSHAK, A; TOMASELLI, I. *Arthrospira (Spirulina*): Systematics and ecophysiology. In: The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda, p. 505 – 522, 2000.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbono dioxide extraction. Food Chemistry, n. 105, 36–41, 2007.

WANG, Q.; ZHANG, Y.; WU, L.; NIU, S.; SONG, C.; ZHANG, Z.; LU, G.; QIAO, C.; HU, Y.; YUEN, K.Y.; et al. Structural and functional basis of sars-cov-2 entry by using human ace2. cell 2020.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Purificar e avaliar a atividade anti-hipertensiva de peptídeos obtidos da digestão gastrointestinal *in vitro* da biomassa da cianobactéria *Arthrospira platensis*.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão sistemática para verificar as algas como potenciais fontes de bioativos anti-hipertensivos;
- Extrair de peptídeos anti-hipertensivos em modelo de digestão *in vitro* em condições fisiológicas simuladas;
- Avaliar atividade inibidora da ECA das proteínas da *A. platensis* após processo de digestão *in vitro* em condições fisiológicas simuladas;
- Purificar os peptídeos e avaliar quanto atividade de inibição da ECA;
- Patentear produto constituído por peptídeos anti-hipertensivos obtidos da *A. platensis*;
- Revisar e analisar quantitativamente a resposta de biomarcadores clássicos de função renal através do uso isolado da *Arthrospira* ou adicionado de outros ingredientes ativos no tratamento de doenças renais.

CAPÍTULO I

AS ALGAS COMO FONTE DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

[1]Gabrielly H. da Silva
[2]Andreza P. de Amorim
[3]Romero M. P. Brandão
[4]Ana Lúcia F. Porto
[5]Raquel P. Bezerra

[1] Mestre em Biociência Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[2] Licenciada em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[3] Professor Adjunto do Departamento de Biologia Celular e Molecular Aplicada. Universidade de Pernambuco - UPE
[4] Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[5] Professora Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Publicado em: An Acad Bras Cienc (2022) 94(2): e20201636 DOI 10.1590/0001-3765202220201636. Anais da Academia Brasileira de Ciências| Annals of the Brazilian Academy of Sciences Printed ISSN 0001-3765 I Online ISSN 1678-2690.

RESUMO

A hipertensão é um fator que contribui para o risco de doenças crônicas. A inibição da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) é uma abordagem terapêutica útil para o tratamento da hipertensão. Devido a sua biomassa ser rica em proteínas, as algas têm sido uma alternativa para a produção de peptídeos inibidores da ECA (iECA) a partir da hidrólise enzimática. O objetivo deste estudo foi revisar sistematicamente a literatura relativa à produção, composição e atividade dos peptídeos de iECA derivados das proteínas de algas. Pesquisas sistemáticas em base de dados identificam 648 artigos relacionados. Ao final da triagem, apenas 14 foram selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade para esta revisão. As macroalgas são mais estudadas do que as microalgas como fontes de peptídeos de iECA. Além disso, os hidrolisados por termolisina ou bromelaína exibiram a maior atividade de iECA em comparação com outras enzimas. As principais características dos peptídeos com elevada inibição da ECA são baixo peso molecular, sequência curta de aminoácidos e padrão de inibição não-competitivo. Estudos *in vivo* utilizando hidrolisados e peptídeos derivados de proteínas de algas mostraram atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensivos (SHR). Assim, sugere-se que os peptídeos de iECA, derivados de algas, podem ser considerados como potenciais anti-hipertensivos.

PALAVRAS-CHAVE: hidrolisado de proteínas de algas, anti-hipertensivo, peptídeos bioativos, hipertensão, peptídeo inibidor.

INTRODUÇÃO

A *American College of Cardiology* (ACC) e a *American Heart Association* (AHA) definem a hipertensão arterial sistêmica (HAS) como uma doença caracterizada pela persistência dos níveis de pressão arterial elevada (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg), estando associada ao risco de desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doenças renais e diabetes (CAPPUCCIO & MILLER 2016; WHELTON et al. 2018). A nível mundial, estima-se que a pressão arterial elevada afeta 1 bilhão de pessoas, aumentando para mais de 1,6 bilhões até 2025 (FERREIRA-SANTOS et al. 2017; HIPPAUF et al. 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). A hipertensão pode ser prevenida através da diminuição da ingestão de sal, gorduras saturadas e trans, e pela mudança no estilo de vida (BROOK et al. 2013). Atualmente, o controle da hipertensão pode ser feito pelo uso de drogas anti-hipertensivas, tais como: diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, beta-bloqueadores, bloqueadores dos receptores de angiotensina-II e inibidores da enzima de conversão de angiotensina-I (ACE; EC 3.4.15.1) (MCMANUS et al. 2012).

Um dos principais mecanismos de controle da pressão arterial é o sistema de renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (CHEN et al. 2018). Quando o sistema é ativado, a renina é secretada do aparelho de justaglomerular do rim, clivando a glicoproteína angiotensinogênio circulante para formar a angiotensina I. A ECA, uma carboxipeptidase dipeptídica contendo zinco, promove a conversão da angiotensina-I para o potente vasoconstritor de angiotensina-II (PUTNAM et al. 2012) e ativador de aldosterona. A aldosterona, que atua sobre a glândula adrenal, promove a reabsorção de sódio, retenção de água e perda de potássio e magnésio, modulando assim o volume do espaço extracelular e a pressão sanguínea (SPÄT & HUNYADY 2004). O ECA é também responsável pela inativação da bradicinina, um vasodilatador no sistema Calicreína-Cinina (SCC) (CHENG et al. 2009, ERIKSSON et al. 2002).

A inibição da ECA é considerada uma abordagem terapêutica útil no tratamento da hipertensão (LAHOGUE ET AL. 2010) e por isso, uma via importante para o desenvolvimento de fármacos para controlar a pressão arterial elevada. Muitos inibidores da ECA (iECA) sintetizados quimicamente, tais como: Captopril©, Enalapril©, Alcacepril© e Lisinopril©, são atualmente utilizados no controle da hipertensão (GARCÍA-MORA et al. 2017). No entanto, podem causar vários efeitos secundários, como tosse seca, perturbações do paladar, erupção cutânea, insuficiência renal (COOPER et al. 2006). A busca por os peptídeos iECA derivados de compostos naturais tem sido uma alternativa emergente por, possivelmente, apresentar reduzido ou nenhum efeito secundário, quando comparados com os medicamentos sintéticos anti-hipertensivos (UDENIGWE & ALUKO 2012). Os peptídeos iECA

foram obtidos a partir de várias fontes de origem natural, como a avelã (LIU et al. 2018), leite kefir (AMORIM et al. 2019), frango (MAS-CAPDEVILA et al. 2018) e algas (XIE et al. 2018).

As algas são organismos vivos multicelulares ou unicelulares ricos em biocompostos com várias aplicações biotecnológicas (KIURU et al. 2014, LOUREIRO et al. 2018, FITZGERALD et al. 2011). Por exemplo, a fração lipídica pode ser utilizada como produção de biodiesel renovável e sustentável (FRUMENTO et al., 2013, ARATBONI et al., 2019, FALKOWSKI, 2004); a biomassa inteira pode ser aplicada na biorremediação de águas residuais (SALAMA et al., 2019) e na aquicultura (ALLEN et al., 2019); compostos bioativos como peptídeos, proteínas, ácidos gordos, metabolitos secundários têm propriedades benéficas para a saúde (DEROSE et al., 2019, PRIYADARSHANI & RATH, 2012) com ação anti-inflamatória (FERNANDO et al., 2016), anti-cancerígena (ZHANG et al., 2019), antimicrobiana (PANE et al., 2015) e iECA (DENG et al., 2018). Assim, o objetivo deste estudo, foi revisar sistematicamente a literatura relativa à produção, composição e atividade dos peptídeos iECA derivados de proteínas de algas.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESTRATÉGIA DE BUSCA

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica utilizando as bases de dados eletrônicas: PubMed, *Springerlink*, *ScienceDirect* e *Molecular Diversity Preservation International* (MDPI), de 2012 a 2019. Palavras-chave e termos de pesquisa (individualmente ou combinados) foram "peptídeos inibidores da ECA", "peptídeos inibidores", "enzima conversora de angiotensina-I", "algas".

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Os estudos considerados elegíveis foram os escritos em inglês, descrevendo a atividade iECA de peptídeos isolados de algas. Foram excluídos artigos de revisão, comunicações curtas, cartas, comentários, resumos de congressos e estudos com informação insuficiente.

AVALIAÇÃO DO RISCO DE VIES E CRITÉRIOS QUALITATIVOS

O *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MASTARI*) (O Manual de Revisão do Instituto Joanna Briggs, 2014), com algumas modificações, foi utilizado para verificar o risco de enviesamento de cada estudo. Sete critérios de qualidade foram avaliados utilizando as seguintes perguntas: (1) "O artigo relata o procedimento para obter compostos bioativos?", (2) "O artigo relata a descrição do processo de realização da atividade biológica *in vitro*?", (3) "O artigo relata o peso molecular dos peptídeos? ", (4) "O artigo caracteriza os peptídeos de iECA?", (5) "O artigo descreve o modo de inibição dos peptídeos de iECA?", (6) "O artigo utiliza uma sequência diferente de métodos para identificar os peptídeos?" e (7) "O artigo determina o IC50 do peptídeo?".

Cada artigo foi avaliado como "sim", "não", "pouco claro" ou "não aplicável" e o risco de enviesamento foi classificado de acordo com a soma das marcas de "sim" recebidas como se segue: 0 a 49% (alto risco de enviesamento), 50 a 70% (risco médio de enviesamento), 71 a 100% (baixo risco de enviesamento). Além disso, a frequência do "sim" para cada critério foi utilizada para verificar a

sua qualidade e classificada como boa (>70%), moderada (70 ≤ critérios de qualidade ≤ 50%) e baixa (<50%).

RESULTADOS

A **figura 1** mostra o fluxograma para a seleção do estudo. Através da pesquisa bibliográfica, obtivemos 295 artigos do PubMed, 253 artigos do ScienceDirect, 55 artigos do SpringerLink e 45 artigos do MDPI, totalizando 648 artigos. Foi identificado um total de 640 artigos após a remoção de duplicados. O título e o resumo foram examinados e apenas 15 artigos foram selecionados para avaliação do texto completo. Destes, 1 artigo foi excluído porque a atividade da iECA foi avaliada utilizando extratos proteicos de algas em vez de peptídeos purificados.

Um total de 14 artigos elegíveis foram submetidos a uma avaliação do risco de enviesamento sobre o protocolo *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MASTARI*) (THE JOANNA BRIGGS INSTITUTE REVIEWERS' MANUAL, 2014; GADIOLI et al. 2018) com algumas modificações. Todos os estudos foram considerados com "baixo risco de enviesamento", porque a frequência do "sim" era superior a 70%. Assim, nenhum estudo foi retirado da revisão (**Tabela I**). Como se mostra no **Quadro II,** os critérios de qualidade 1, 2, 4, 6 e 7 foram atendidos por mais de 70% dos estudos, sendo classificados como "bons", enquanto os critérios 3 e 5 foram respondidos por 50% dos estudos, obtendo-se uma qualidade "moderada".

Um total de 13 espécies de algas foram identificadas com potenciais atividades iECA (**Quadro III**). As macroalgas (n = 9) pertencem à divisão *Chlorophyta* (Algas Verdes) (n = 5), predominantemente do gênero *Ulva*, seguida pela divisão *Rhodophyta* (Algas Vermelhas) (n = 4). Microalgas (n = 5) inclui a divisão principal *Chlorophyta* (Algas Verdes), sendo todos os gêneros *Chlorella*, seguidos pela divisão *Ochrophyta* (n = 1) e *Haptophyta* (n = 1).

Figura 1. Fluxograma para identificação e seleção de estudos adaptado de Moher et al. (2009).

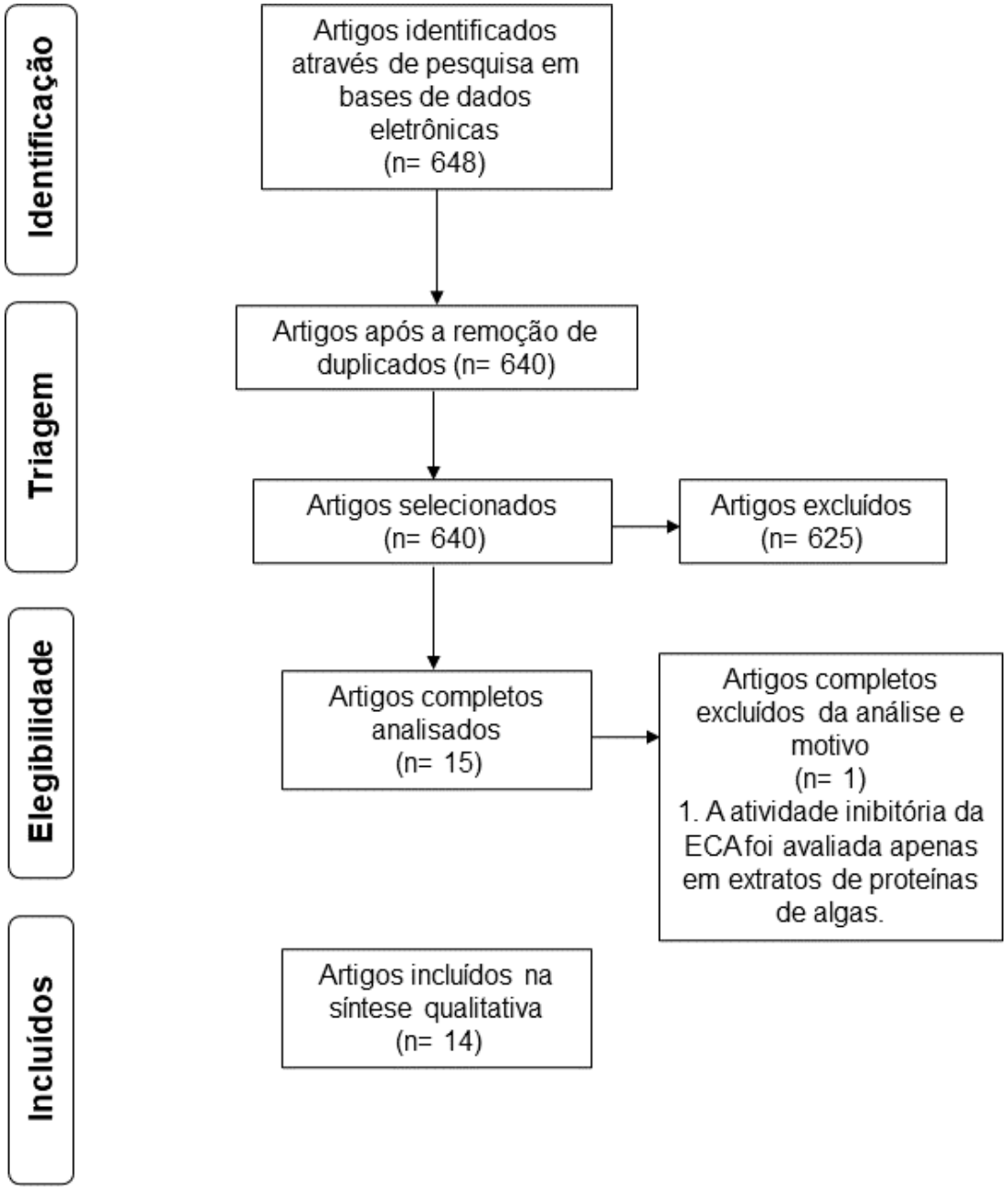


Tabela I. Avaliação do risco de enviesamento e critérios de qualidade dos estudos selecionados para a revisão sistemática sobre os peptídeos iECA de algas.

Referências	O artigo relata o procedimento para a obtenção de compostos bioativos?	O artigo relata a descrição do processo de realização da atividade biológica ?	O artigo relata o peso molecular dos peptídeos?	O artigo caracteriza os peptídeos iECA?	O artigo descreve o modo de inibição dos peptídeos de iECA?	O artigo utiliza uma sequência diferente de métodos para identificar os peptídeos?	O artigo determina o IC50 do peptídeo?	Porcentagem de respostas positivas (sim) para cada estudo que atingiu o risco de enviesamento
Pan et al. (2016)	S	S	S	S	S	S	S	100
Wu et al. (2016)	S	S	N	S	N	S	S	71.4
Paiva et al. (2016)	S	S	N	S	S	S	S	85.7
Furuta et al. (2016)	S	S	N	S	N	S	S	71.4
Cao et al. (2017)	S	S	N	S	N	S	S	71.4
Joel et al. (2018)	S	S	N	S	S	S	S	85.7
Garcia-Vaquero et al. (2018)	S	S	S	S	N	S	N	71.4
Deng et al. (2018)	S	S	S	S	S	N	S	85.7
Sun et al. (2019)	S	S	N	S	N	S	S	71.4
Ko et al. (2012)	S	S	S	S	S	S	S	100
Samarakoon et al. (2013)	S	S	S	S	N	S	S	85.4
Wu et al. (2014)	N	S	N	S	S	S	S	85.4
Lin et al. (2018)	S	S	S	S	N	S	S	71.4

Xie et al. (2018)	S	S	S	S	S	N	S	71.4
Percentage of positive answers (yes) for each quality criteria (%)	100	100	50	100	50	85	92	-

S = Sim; N = Não; PC = Pouco claro; NA= Não aplicável.

Quadro II. Porcentagem de respostas positivas (sim) para cada critério de qualidade.

Critério qualitativo	**Porcentagem (%)**
O artigo relata o procedimento para a obtenção de compostos bioativos?	100
O artigo relata a descrição do processo de realização da atividade biológica *in vitro*?	100
O artigo relata o peso molecular dos peptídeos?	50
O artigo caracteriza os peptídeos iECA?	100
O artigo descreve o modo de inibição dos peptídeos de iECA?	50
O artigo utiliza uma sequência diferente de métodos para identificar os peptídeos?	85
O artigo determina o IC50 do peptídeo?	92

Quadro III. Peptídeos inibitórios da ECA derivados de algas.

Espécies	Enzimas	Método de Purificação	Peptideos	IC_{50}	Padrão de Inibição	Referência
Macroalgas						
Enteromorpha clathrata	Alcalase	Ultrafiltração (UF), gel filtração sephadex G-15 e cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC)	PAFG	35.9 μM	Não-competitivo	Pan et al. (2016)
Bangia. fusco-purpurea	Pepsina e tripsina	Sephadex G-15 coluna chromatográfica, RP-HPLC	ALLAGDPSVLEDR, VVGGTGPVDEWGIGAR	57.2 ± 5.0 e 66.2 ± 4.2 μg/mL	-	Wu et al. (2016)
Ulva rigida	Pepsina e bromelaina	UF, sephadex G-25 coluna de exclusão por peso molecular, RP-HPLC	IP, AFL	0.020 e 0.023 mg/mL	Não-competitivo, competitivo	Paiva et al. (2016)
Palmaria palmata	Termolisina	UF, Sephadex G-25 coluna gel filtração, RP-HPLC	LRY	0.044 μM	-	Furuta et al. (2016)
Gracilariopsis lemaneiformis	Tripsina	Sephadex G-15 coluna gel filtração , cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)	QVEY	474.36 μM	-	Cao et al. (2017)
Caulerpa lentillifera	Termolisina	UF, RP-HPLC	FDGIP, AIDPVRA	58.89 ± 0.68 e 65.76 ± 0.92μM	Competitivo, competitivo	Joel et al. (2018)
Ulva luctua	Papaina	UF, HPLC	48 peptídeos diferentes	-	-	Garcia-Vaquero et al. (2019)
Gracilariopsis lemaneiformis	Tripsina	UF	FQINMCILR, TGAPCR	9.64 ± 0.36 e 23.94 ± 0.82 μM	Não-competitivo, Não-competitivo	Deng et al. (2018)

Quadro III. Continuação...

Ulva intestinalis	Tripsina	UF, colunas gel filtração Sephadex G-25 , Sephadex G-15; RP-HPLC	FGMPLDR, MELVLR	219.35 e 236.85 μM	-	Sun et al. (2019)
Microalgae						
Chlorella ellipsoidea	Alcalase	UF, coluna gel filtração Sephadex G-25; RP-HPLC	VGGY	128.4 μM	Competitivo	Ko et al. (2012)
Nannochloropsis oculata	Pepsina	UF, coluna gel filtração Sephadex G-25 ; RP-HPLC	GMNNLTP, LEQ	123 e 173 μM	-	Samarakoon et al. (2013)
Isochrysis galbana	Tripsinaa	Coluna gel filtração Sephadex G-25; HIC	YMGLDLK	36.1 μM	Não-competitivo	Wu et al. (2014)
Chlorella sorokiniana	Protease N	Coluna gel filtração Sephadex G-15; HPLC	WV, VW, IW, LW	307.61, 0.58, 0.50, e 1.11 μM,	-	Lin et al. (2018)
Chlorella vulgaris	Pepsina, tripsina e quimiotripsina (*in silico*)	-	TTW, VHW	0.61 ± 0.12 e 0.91 ± 0.31 μM	Não-competitivo, Não-competitivo	Xie et al. (2018)

Quadro IV. Efeitos da administração de hidrolisados e peptídeos derivados de algas na pressão arterial sistólica (PAS) de ratos espontaneamente hipertensivos.

Espécies	Peptídeos	PAS redução máxima (mmHg)	Referência
Chlorella ellipsoidea	VEGY	- 22.8 mmHg após 4 h	Ko et al. (2012)
Chlorella vulgaris	TTWT	- 35 mmHg após 2 h	Xie et al. (2018)
	VHW	- 50 mmHg após 2h	
Chlorella sorokiniana		-11.1 mmHg após 6 h	Lin et al. (2018)
		-21 mmHg após 6 h	
Gracilariopsis lemaneiformis	TTWT	- 34 mmHg após 2 h	Deng et al (2018)
	VHW	- 27 mmHg após 2 h	

Métodos de produção dos peptídeos iECA

Os peptídeos foram produzidos por hidrólise enzimática usando uma única enzima ou combinações enzimáticas. As enzimas foram obtidas do trato gastrointestinal (pepsina, tripsina e quimotripsina), origem microbiana (alcalase e termolisina) e/ou proteases vegetais (bromelaína e papaína). A tripsina tem sido amplamente utilizada para hidrolisar proteínas derivadas de algas (n = 6). Alguns autores (n = 7) relataram atividades de iECA após a hidrólise enzimática e os maiores graus de inibição foram em hidrolisados usando termolisina ou bromelaína.

Métodos distintos podem ser utilizados isolados ou em combinação para purificar os peptídeos (**Quadro III**). Os peptídeos foram purificados a partir de proteínas de algas por ultrafiltração (UF) (n = 9), coluna de filtração em gel Sephadex G-25 (n= 6), coluna de filtração em gel Sephadex G-15 (n= 5), cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) (n= 2) e/ou cromatografia líquida de alto rendimento de fase reversa (RP-HPLC) (n= 10). Como se mostra no **Quadro III**, as sequências de peptídeos derivados de proteínas de algas são de cadeia curta e contêm aminoácidos aromáticos na sua sequência. Além disso, há correlação entre peptídeos de baixo peso molecular e bioatividades elevadas. A atividade dos peptídeos é expressa no valor IC50, que é a concentração do peptídeo que inibe 50% da atividade da ECA.

Métodos de inibição da ECA *in vitro*

O modo de inibição *in vitro* dos peptídeos de iECA foi avaliado pelas equações de *Lineweaver-Burk*. A inibição não competitiva (n= 5) e competitiva (n= 4) foram os mecanismos de inibição dos peptídeos da iECA. Entre estes, os inibidores não-competitivos mostraram melhores valores de IC50 quando comparados com outros mecanismos de inibição (**Quadro III**).

Vários ensaios *in vitro* foram utilizados para a determinação da inibição da ECA. O método mais utilizado (n= 11) é descrito por Cushman & Cheung (1971) em que a concentração de ácido hipúrico de *hipuril-L-histidil-L-leucina* (HHL) substrato da ECA é quantificado; seguido pelo método que utiliza *furanacroloil-Phe-Glu-Glu* (FA-PGG) como outro subtrato da ECA (n= 2) e, finalmente, pelo kit de detecção de *3-hidroxibutirato* (3-HB) produzido a partir de *3-hidroxibutiril-Gly-Gly-Gly* (3HB-GGG) (n= 1).

Análise do potencial anti-hipertensivo de peptídeos contidos em micro e macroalgas em ratos espontaneamente hipertensos

Peptídeos purificados e proteínas hidrolisadas com atividade anti-hipertensiva foram investigados em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) (**Quadro IV**). A maioria dos peptídeos e proteínas hidrolisadas de microalgas (n= 3), principalmente macroalgas do gênero *Chlorella* e *Gracilariopsis* (n= 1), mostraram efeitos anti-hipertensivos *in vivo*. As doses utilizadas nos estudos variaram de 5 a 60 mg/kg e, em todos os casos, foram encontrados efeitos positivos de redução da pressão arterial.

DISCUSSÃO

Macroalgas e microalgas são consideradas fontes de proteínas, hidratos de carbono, minerais, vitaminas (FITZGERALD et al., 2011, LARSEN et al., 2011) e podem acumular > 50% de proteínas na sua matéria seca (BECKER, 2007). Devido a estas propriedades, os peptídeos com atividade anti-hipertensiva foram isolados de várias algas e cianobactérias (HE et al., 2013). Entre as espécies de algas, *Ulva* e *Chlorella (Chlorophyta*) são as principais fontes de peptídeos iECA (Quadro III). De fato, as algas da divisão *Chlorophyta* são as mais promissoras a serem exploradas como fontes de peptídeos bioativos, devido ao seu elevado conteúdo proteico quando comparadas com outras divisões (GARCÍA-VAQUERO, 2018).

Os peptídeos bioativos são definidos como sequências de peptídeos dentro de uma proteína com efeitos benéficos nas funções corporais e/ou com impactos positivos na saúde humana (KITTS & WEILER, 2003). É libertado por hidrólise enzimática e por processo de fermentação (ABDEL-HAMID et al., 2017; BABINI et al., 2017; WANG et al., 2013). No entanto, o método de hidrólise enzimática tem vantagens quando comparado com a fermentação, porque é fácil de escalar e geralmente tem um tempo de reação mais curto do que a fermentação microbiana (DALIRI et al., 2017). Os peptídeos bioativos libertados da hidrólise enzimática mostraram multi-bioatividade, incluindo antioxidante (JANG et al., 2017), anti-inflamatório (JOSHI ET AL., 2016) e anti-hipertensivo (LIN et al., 2018). São relatadas diferentes enzimas responsáveis por hidrolisar proteínas da biomassa de algas e para produzir peptídeos de iECA. Espécies de algas, enzimas, método de purificação, peptídeo, valor de IC50 e padrão de inibição podem ser vistos no Quadro III.

Diversos estudos descrevem o tipo e concentração de protease para obter peptídeos bioativos específicos. Além disso, é possível utilizar uma única enzima ou duas ou mais enzimas (KIM & WIJESEKARA, 2010). Condições físico-químicas das enzimas no processo e condições de hidrólise,

tais como temperatura e pH, são fatores importantes na composição do peptídeo e na atividade iECA (GARCÍA-VAQUERO, 2018). As proteínas de algas digeridas pela termolisina produzem peptídeos com atividade elevada de iECA. Além disso, estudos anteriores utilizando outros recursos naturais também revelaram que a termolisina é uma das proteases mais eficientes para a produção de hidrolisados com atividade elevada de iECA (GARCÍA et al., 2015; NAKASHIMA et al., 2002; VÁSQUEZ-VILLANUEVA et al., 2015). De fato, estas enzimas têm vantagens em comparação com outras enzimas devido ao seu elevado grau de especificidade na produção de peptídeos de cadeia curta com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tais como Phe ou Leu, que são importantes para a atividade dos peptídeos anti-hipertensivos (PANK et al., 1982).

A bromelaína é a segunda enzima mais utilizada para obter extrato de algas com elevada atividade de iECA. O uso isolado de bromelaína nas algas *Ulva rigida* resultou em 1,4 vezes mais do que o uso em combinação com tripsina (PAIVA et al., 2016). Isto sugere que a termolisina e a bromelaína tem potencial para ser utilizada para produzir peptídeos de iECA derivados de algas, uma vez que os hidrolisados libertados têm elevada inibição de ECA quando libertados por outras enzimas.

No entanto, a seleção da enzima tem um papel fundamental na composição dos aminoácidos. A utilização da mesma enzima em diferentes espécies de algas pode causar um perfil de diferentes peptídeos (Quadro III), uma vez que as algas vermelhas têm quantidades baixas de leucina e isoleucina, enquanto as algas marrons têm frequentemente metionina e cisteína limitadas (DAWCZYNSKI et al., 2007; MIŠURCOVÁ et al., 2014). Por conseguinte, a seleção das espécies de algas é também um fator importante para a produção de peptídeos com elevada atividade de iECA.

O peso molecular dos peptídeos influencia na atividade da iECA (PUJIASTUTI et al., 2019). Com o objetivo de separar os peptídeos com base no seu peso molecular, um dos métodos de fracionamento é o Ultrafiltração (UF), que consiste em separar peptídeos de acordo com o seu tamanho utilizando uma membrana com diferentes *cut-off* (CAO et al., 2017; SUN et al., 2019). Ko et al. (2012) relataram que <5 kDa fração de hidrolisados de *Chlorella ellipsoidea* tinham maior atividade iECA (IC_{50} = 0,89 ± 0,04 mg mL^{-1}), enquanto essa proteína digerida de *Ulva rigida* em fração < 1kDa obteve valor IC_{50} de 0,095 ± 0,003 mg mL^{-1}. Estudos semelhantes utilizando outras fontes naturais tinham demonstrado o maior efeito anti-hipertensivo em frações com baixo peso molecular (UG et al., 2019; VÁSQUEZ-VILLANUEVA et al., 2015).

Para aumentar a bioatividade, as frações com maior atividade iECA são purificadas após o processo UF (FURUTA et al.. 2016; PAIVA et al., 2017). Diferentes métodos de cromatografia, tais como a coluna de filtração em gel, CIH e HPLC (CAO et al., 2017), são utilizados isolados ou em combinações (**Tabela III**). Pan et al. (2016) relataram uma diminuição no valor de IC50 de peptídeos de *Enteromorpha clathrata* de 12,14 mg mL^{-1} no extrato hidrolisado por enzimas para 0,255 mg mL^{-1}

na última etapa de purificação. Samarakoon et al. (2013) relataram que a fração < 5kDa dos hidrolisados de *Nannochloropsis oculata* apresentou um IC_{50} de 2,721 ± 0,13 mg mL^{-1} e, após o processo de purificação, o valor de IC_{50} diminuiu para 0,090 ± 0,002 mg mL^{-1}. Os hidrolisados de *Chlorella sorokiniana* com IC_{50} de 0,035 ± 0,002 diminuíram para 0,015 mg mL^{-1} após as etapas de purificação cromatográfica de exclusão de tamanho e RP-HLC (LIN et al., 2018). Estes resultados sublinham que a adição de purificação é um passo importante para fornecer peptídeos com elevada atividade de iECA.

O perfil dos aminoácidos pode contribuir para a atividade de iECA. Os peptídeos LRY, IP e VHW apresentaram os valores mais baixos de IC_{50} (0,044 μM, 0,020 mg mL^{-1} e 0,31 μM, respectivamente) (**Tabela III**). Estes três peptídeos têm um teor de aminoácidos hidrofóbicos no C-terminal que contribui para uma atividade elevada. A composição dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos C e N-terminais de iECA tem efeitos significativos no nível de inibição da ECA (LIN et al. 2018), especialmente quando o resíduo C-terminal é Tyr, Phe, Pro, Trp ou Leu e o resíduo N-terminal é um aminoácido hidrofóbico de cadeia ramificada alifática. Além disso, LRY, IP e VHW são compostos por 2 a 3 aminoácidos, que também podem desempenhar um papel crucial nas atividades iECA. De acordo com estudos anteriores, a maioria dos peptídeos são curtos, com 2 a 12 resíduos de aminoácidos e podem interagir mais facilmente no sítio ativo da ECA, melhorando a atividade inibitória (LI et al., 2018; WU et al., 2006).

O padrão de inibição da ECA do peptídeo purificado derivado de algas foi estimado por gráficos Lineweaver - Burk. Os peptídeos podem ter um padrão de inibição não-competitivo ou competitivo. O padrão de inibição não competitiva é definido quando o inibidor se liga a um sítio diferente do sítio ativo da enzima, altera a conformação estrutural e diminui a atividade (KIM & WIJESEKARA, 2010), enquanto no padrão de inibição competitiva, o inibidor liga-se ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato. Os peptídeos não-competitivos têm valores de IC_{50} mais baixos quando comparados com os peptídeos competitivos (Quadro III). Contudo, a relação entre a atividade da iECA e o padrão de inibição ainda são pouco explicadas, por isso, são necessárias mais investigações para esta elucidação.

A atividade da iECA pode ser avaliada por diferentes métodos *in vitro*. O método descrito por Cushman & Cheung (1971) é o mais utilizado. Outros métodos foram listados para superar a menor seletividade e sensibilidade (SHALABY et al., 2006). A utilização do substrato FAPGG tem sido uma alternativa à determinação da atividade iECA (HENDA et al., 2013; SHALABY et al., 2006). Além disso, outras técnicas analíticas podem ser utilizadas para quantificar a atividade da ECA, como o 3-HB produzido a partir de (3HB-GGG) *furanocryloyl.*

A biodisponibilidade dos peptídeos pode ser alterada após a administração oral. É importante que estes peptídeos sejam resistentes à ação das enzimas do trato gastrointestinal para chegarem à corrente sanguínea (JAO et al., 2012). Lin et al. (2018) examinaram os efeitos anti-hipertensivos da *C. sorakiniana* hidrolisada em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) a duas doses, 30 e 60 mg/kg de peso corporal, e observaram uma atividade mais elevada a 60 mg/kg. Uma dose única (10 mg/kg p.c) do peptídeo VEGY de *C. elipsoidea* foi administrada sobre uma SHR e resultou numa redução da pressão arterial após 4 horas de administração oral (KO et al., 2012). Contudo, entre os peptídeos avaliados por ensaios *in vivo* (**Quadro IV**), dois peptídeos derivados das proteínas *C. vulgaris*, TTWT e VHW, tiveram uma atividade anti-hipertensiva mais eficaz (XIE et al., 2018). No peptídeo VHW, a presença de resíduos de Val em N-terminal e de aminoácido aromático em C-terminal na cadeia curta do peptídeo poderia contribuir para uma maior inibição da ECA quando comparada com outros peptídeos. Embora tenham sido obtidos efeitos anti-hipertensivos significativos, ainda há informação limitada sobre os efeitos *in vivo* dos peptídeos derivados de algas. Por conseguinte, são necessários estudos adicionais sobre biodisponibilidade *in vivo* para melhor compreender os efeitos destes peptídeos anti-hipertensivos.

CONCLUSÃO

Os peptídeos iECA derivados de macroalgas e microalgas têm um potencial anti-hipertensivo. No entanto, poucos estudos com proteínas de microalgas foram publicados, indicando que são necessárias mais investigações utilizando microalgas. Os resultados sugerem que as enzimas termolisina ou bromelaína são promissoras para produzir hidrolisados com elevada atividade de iECA. Além disso, este estudo indicou que os peptídeos curtos com aminoácidos hidrofóbicos no C-terminal e com padrão de inibição não-competitivo são mais eficazes. Alguns estudos utilizando modelos *in vivo* mostraram efeitos anti-hipertensivos significativos. No entanto, é necessário muito mais análises *in vivo* para compreender a eficácia do peptídeo iECA derivado de algas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (BIC-0033-2.08/20; APQ-0252-5.07/14) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Processo 88887.785013/2020-00, Código Financeiro 001).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

(I) Concepção e desenho: AP de Amorim, RP Bezerra; (II) Fornecimento de materiais de estudo: Dados literários; (III) Recolha e montagem de dados: AP de Amorim, GH da Silva; (IV) Análise e interpretação de dados: Todos os autores; (V) Escrita do manuscrito: Todos os autores; (VI) Aprovação final do manuscrito: Todos os autores.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID M, OTTE J, DE GOBBA C, OSMAN A, & HAMAD E. 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. Int Dairy J, *66*, 91–98. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.11.006

ALLEN KM, HABTE-TSION HM, THOMPSON KR, FILER K, TIDWELL JH, & KUMAR V. 2019. Freshwater microalgae (Schizochytrium sp.) as a substitute to fish oil for shrimp feed. Sci Rep, 16;9(1):6178. doi: 10.1038/s41598-019-41020-8.

AMORIM FG ET AL. 2019. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. Food Chem, *282*, 109–119. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.010

ARATBONI AH, RAFIEI N, GARCIA-GRANADOS R, ALEMZADEH A, & MORONES-RAMÍREZ JR. 2019. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microb Cell Fact, 18(1). doi:10.1186/s12934-019-1228-4

BABINI E, TAGLIAZUCCHI D, MARTINI S, DEI PIÙ L, & GIANOTTI A. 2017. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. Food Chem, *228*, 186–196. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.143

BECKER EW. 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnol Adv, *25*(2), 207–210. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

BROOK RD ET AL. 2013. Beyond Medications and Diet: Alternative Approaches to Lowering Blood Pressure. Hypertension, *61*(6), 1360–1383. doi: 10.1161/HYP.0b013e318293645f

CAO D, LV X, XU X, YU H, SUN X, & XU N. 2017. Purification and identification of a novel ACE inhibitory peptide from marine alga *Gracilariopsis lemaneiformis* protein hydrolysate. Eur Food Res Technol, *243*(10), 1829–1837. doi: 10.1007/s00217-017-2886-2

CAPPUCCIO FP, & MILLER MA. 2016. Cardiovascular disease and hypertension in sub-Saharan Africa: burden, risk and interventions. Intern Emerg Med, *11*(3), 299–305. doi: 10.1007/s11739-016-1423-9

CHENG FY, WAN TC, LIU YT, CHEN CM, LIN LC. & SAKATA R. 2009. Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. Anim Sci J, *80*(1), 91–97. doi: 10.1111/j.1740-0929.2008. 00601.x

CHEN Y, GAO X, WEI Y, LIU Q, JIANG Y, ZHAO L, & ULAAH S. 2018. Isolation, purification and the anti-hypertensive effect of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum* fermented with *Bacillus natto*. Food Funct, *9*(10), 5230–5237. doi: 10.1039/C8FO01146J

COOPER WO, HERNANDEZ-DIAZ S, ARBOGAST PG, DUDLEY JA, DYER S, GIDEON PS, HALL K, & RAY WA. 2006. Major Congenital Malformations after First-Trimester Exposure to ACE Inhibitors. N Engl J Med, *354*(23), 2443–2451. doi: 10.1056/NEJMoa055202

CUSHMAN DW, & CHEUNG HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol, *20*(7), 1637–1648. doi: 10.1016/0006-2952(71)90292-9

DALIRI E, OH D, & LE, B 2017. Bioactive Peptides. Foods, *6*(5), 32. doi: 10.3390/foods6050032

DAWCZYNSKI C, SCHUBERT R, & JAHREIS G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. Food Chem, *103*(3), 891–899. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.09.041

DENG Z, LIU Y, WANG J, WU S, GENG L, SUI Z, & ZHANG Q. 2018. Antihypertensive Effects of Two Novel Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) in Spontaneously Hypertensive Rats (SHRs). Mar Drugs, 16(9), 299. doi: 10.3390/md16090299

DEROSE K, DEMILL C, DAVIS RW, & QUINN JC. 2019. Integrated techno economic and life cycle assessment of the conversion of high productivity, low lipid algae to renewable fuels. Algal Res., 38, 101412. doi:10.1016/j.algal.2019.101412

ERIKSSON U, DANILCZYK U, & PENNINGER JM. 2002. Just the Beginning: Novel Functions for Angiotensin-Converting Enzymes. Curr Biol, 12(21), R745–R752. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01255-1

FALKOWSKI PG 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. Science, 305(5682), 354–360. doi: 10.1126/science.1095964

FERNANDO IPS, NAH JW, & JEON YJ. 2016. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. Environ Toxicol Pharmacol, *48*, 22–30. doi: 10.1016/j.etap.2016.09.023

FERREIRA-SANTOS P, CARRÓN R, RECIO I, SEVILLA MÁ, & MONTERO MJ 2017. Effects of milk casein hydrolyzate supplemented with phytosterols on hypertension and lipid profile in hypercholesterolemic hypertensive rats. J Funct Food, *28*, 168–176. doi: 10.1016/j.jff.2016.11.020

FITZGERALD C, GALLAGHER E, TASDEMIR D, & HAYES M. 2011. Heart Health Peptides from Macroalgae and Their Potential Use in Functional Foods. J Agric Food Chem, *59*(13), 6829–6836. doi: 10.1021/jf201114d

FRUMENTO D, CASAZZA AA, ARNI AS, & CONVERTI A. 2013. Cultivation of Chlorella vulgaris in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. Biochem Eng J, 81, 120–125. doi:10.1016/j.bej.2013.10.011

FURUTA T, MIYABE Y, YASUI H, KINOSHITA Y, & KISHIMURA H. 2016. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Phycobiliproteins of Dulse *Palmaria palmata.* Mar Drugs, 14(2), 32. doi: 10.3390/md14020032

GADIOLI IL, DA CUNHA M, DE SB, DE CARVALHO MVO, COSTA AM, & PINELI L, DE L DE O. (2018). A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for

food, nutrition, and popular medicine. Crit Rev Food Sci Nutr, *58*(5), 785–807. doi: 10.1080/10408398.2016.1224805

GARCÍA MC, ENDERMANN J, GONZÁLEZ-GARCÍA E, & MARINA ML. 2015. HPLC-Q-TOF-MS Identification of Antioxidant and Antihypertensive Peptides Recovered from Cherry (*Prunus cerasus* L.) Subproducts. J Agric Food Chem, *63*(5), 1514–1520. doi: 10.1021/jf505037p

GARCÍA-MORA P, MARTÍN-MARTÍNEZ M, ANGELES BONACHE M, GONZÁLEZ-MÚNIZ R, PEÑAS E, FRIAS J, & MARTINEZ-VILLALUENGA C. 2017. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. Food Chem, *221*, 464–472. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.087

GARCÍA-VAQUERO M. 2018. Seaweed Proteins and Applications in Animal Feed. In Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture (pp. 139–161). doi: 10.1002/9781119385332.ch7

HE HL, LIU D, & MA CB. 2013. Review on the Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Peptides from Marine Proteins. Appl Biochem Biotechnol, 169(3), 738–749. doi: 10.1007/s12010-012-0024-y

HENDA Y, BEN LABIDI A, ARNAUDIN I, BRIDIAU N, DELATOUCHE R. MAUGARD T, PIOT JM, SANNIER F, THIÉRY V, & BORDENAVE-JUCHEREAU S. 2013. Measuring Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity by Micro Plate Assays: Comparison Using Marine Cryptides and Tentative Threshold Determinations with Captopril and Losartan. J Agric Food Chem, *61*(45), 10685–10690. doi: 10.1021/jf403004e

HIPPAUF F, HUETTNER C, LUNOW D, BORCHARDT L, HENLE T, & KASKEL S. 2016. Towards a continuous adsorption process for the enrichment of ACE-inhibiting peptides from food protein hydrolysates. Carbon, 107, 116–123. doi: 10.1016/j.carbon.2016.05.062

JANG HL, SHIN SR, & YOON KY. 2017. Hydrolysis conditions for antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of sandfish (Arctoscopus japonicus). Food Sci Biotechnol, *26*(5), 1191–1197. doi: 10.1007/s10068-017-0178-z

JAO CL, HUANG SL, & HSU KC. 2012. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. BioMedicine, 2(4), 130–136. doi: 10.1016/j.biomed.2012.06.005

JOEL CH, SUTOPO CCY, PRAJITNO A, SU JH, HSU JL. (2018). Screening of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from *Caulerpa lentillifera*. Molecules, 16;23(11):3005. doi: 10.3390/molecules23113005. PMID: 30453595; PMCID: PMC6278394

JOSHI I, SUDHAKAR S, & NAZEER RA. 2016. Anti-inflammatory Properties of Bioactive Peptide Derived from Gastropod Influenced by Enzymatic Hydrolysis. Appl Biochem Biotechnol, *180*(6), 1128–1140. doi: 10.1007/s12010-016-2156-y

KIM SK, & WIJESEKARA I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J Funct Food, *2*(1), 1–9. doi: 10.1016/j.jff.2010.01.003

KITTS, D., & WEILER, K. (2003). Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. Curr Pharm Des, *9*(16), 1309–1323. doi: 10.2174/1381612033454883

KIURU P, D'AURIA M, MULLER C, TAMMELA P, VUORELA H, & YLI-KAUHALUOMA J. 2014. Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. Planta Medica, *80*(14), 1234–1246. doi: 10.1055/s-0034-1383001

KO SC ET AL. 2012. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. Process Biochem, *47*(12), 2005–2011. doi: 10.1016/j.procbio.2012.07.015

LAHOGUE V, RÉHEL K, TAUPIN L, HARAS D & ALLAUM P. 2010. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Food Chem, 118(3), 870-875. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.080

LARSEN R, EILERTSEN KE, & ELVEVOLL EO. 2011. Health benefits of marine foods and ingredients. Biotechnol Adv, 29(5), 508–518. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.017

LI M, XIA S, ZHANG Y, & LI X. 2018. Optimization of ACE inhibitory peptides from black soybean by microwave-assisted enzymatic method and study on its stability. LWT, 98, 358–365. doi: 10.1016/j.lwt.2018.08.045

LIN YH, CHEN GW, YEH C, SONG H, & TSAI JS. 2018. Purification and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides and the Antihypertensive Effect of *Chlorella sorokiniana* Protein Hydrolysates. Nutrients, 10(10), 1397. doi: 10.3390/nu10101397

LIU C, FANG L, MIN W, LIU J, & LI H. 2018. Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (Corylus heterophylla Fisch.). Food chem, v, *245*, 471–480. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.095

LOUREIRO C, MEDEMA MH, VAN DER OOST J, & SIPKEMA D. 2018. Exploration and exploitation of the environment for novel specialized metabolites. Curr Opin Biotechnol, 50, 206–213. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.017

MAS-CAPDEVILA A, PONS Z, ALEIXANDRE A, BRAVO F, & MUGUERZA B. 2018. Dose-Related Antihypertensive Properties and the Corresponding Mechanisms of a Chicken Foot Hydrolysate in Hypertensive Rats. Nutrients, 10(9), 1295. doi: 10.3390/nu10091295

MCMANUS RJ, CAULFIELD M, & WILLIAMS B. 2012. NICE hypertension guideline 2011: evidence based evolution. BMJ, *344*(jan13 1), e181–e181. doi: 10.1136/bmj. e181

MIŠURCOVÁ L, BUŇKA F, VÁVRA AMBROŽOVÁ J, MACHŮ L, SAMEK D, & KRÁČMAR S. 2014. Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. Food Chem, *151*, 120–125. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.040

MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, & ALTMAN DG. 2009. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Medicine, *6*(7), e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097

NAKASHIMA Y, ARIHARA K, SASAKI A, MIO H, ISHIKAW, S, & ITOH M. 2002. Antihypertensive Activities of Peptides Derived from Porcine Skeletal Muscle Myosin in Spontaneously Hypertensive Rats. J Food Sci, *67*(1), 434–437. doi: 10.1111/j.1365-2621. 2002.tb11424.x

PAIVA L, LIMA E, NETO A, & BAPTISTA J. 2017. Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, Antioxidant Properties, Phenolic Content and Amino Acid Profiles of *Fucus spiralis* L. Protein Hydrolysate Fractions. Mar Drugs, 15(10), 311. doi: 10.3390/md15100311

PAIVA, L., LIMA, E., NETO, A. I., & BAPTISTA, J. 2016. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Ulva rigida C. Agardh protein hydrolysate. J Funct Food, *26*, 65–76. doi: 10.1016/j.jff.2016.07.006

PANE G, CACCIOLA G, GIACCO E, MARIOTTINI G, & COPPO E. 2015. Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. Mar Drugs, 13(10), 6440–6452. doi: 10.3390/md13106440

PANK M, KIRRET O, PABERIT N, & AAVIKSAAR A. 1982. Hydrophobic interaction in thermolysin specificity. FEBS Letters, 142(2), 297–300. doi: 10.1016/0014-5793(82)80156-7

PAN S, WANG S, JING L, & YAO D. 2016. Purification and characterisation of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptide derived from the enzymatic hydrolysate of Enteromorpha clathrata protein. Food Chem, *211*, 423–430. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.087

PRIYADARSHANI I, RATH B. 2012. Bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria: utility and applications. Intern J Pharmac Sci and Research. Vol. 3. 4123-4130.

PUJIASTUTI DY, GHOYATUL AMIN MN, ALAMSJAH MA, & HSU JL. 2019. Marine Organisms as Potential Sources of Bioactive Peptides that Inhibit the Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme: A Review. Molecules, *24*(14), 2541. doi: 10.3390/molecules24142541

PUTNAM K, SHOEMAKE, R, YIANNIKOURIS F, & CASSIS LA. 2012. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. Am J Physiol Heart Circ Physiol, *302*(6), H1219–H1230. doi: 10.1152/ajpheart.00796.2011

SALAMA ES, ROH HS, DEV S, KHAN MA, ABOU-SHANAB RAI, CHANG SW, & JEON BH. 2019. Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater. World J Microbiol Biotechnol., 3;35(5):75. doi: 10.1007/s11274-019-2648-3.

SAMARAKOON KW, O-NAM K, KO JY, LEE JH, KANG MC, KIM D, LEE JB, LEE JS, & JEON YJ. 2013. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (Nannochloropsis oculata) protein hydrolysate. J Appl Phycol, 25(5), 1595–1606. doi: 10.1007/s10811-013-9994-6

SHALABY, SM., ZAKORA, M, & OTTE, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. J Dairy Res, *73*(2), 178–186. doi: 10.1017/S0022029905001639

SPÄT A, & HUNYADY L. 2004. Control of Aldosterone Secretion: A Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways. Physiol Rev, *84*(2), 489–539. doi: 10.1152/physrev.00030.2003

SUN S, XU X, SUN X, ZHANG X, CHEN X, & XU N. 2019. Preparation and Identification of ACE Inhibitory Peptides from the Marine Macroalga Ulva intestinalis. Mar. Drugs, 17(3), 179. doi: 10.3390/md17030179

THE JOANNA BRIGGS INSTITUTE REVIEWERS' Manual 2014. 2014. The Joanna Briggs Institute Reviewers' Manual 2014.

UDENIGWE CC, & ALUKO, RE. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. J Food Sci, *77*(1), R11–R24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x

UG Y, BHAT I, KARUNASAGAR I, & B.S M. 2019. Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. Crit Rev Food Sci Nutr, *59*(15), 2363–2374. doi: 10.1080/10408398.2018.1452182

VÁSQUEZ-VILLANUEVA R, MARINA ML, & GARCÍA MC. 2015. Revalorization of a peach (Prunus persica (L.) Batsch) byproduct: Extraction and characterization of ACE-inhibitory peptides from peach stones. J Funct Food, *18*, 137–146. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.056

WANG H, ZHANG S, SUN Y, & DAI Y. 2013. ACE-Inhibitory Peptide Isolated from Fermented Soybean Meal as Functional Food Int J Food Eng *9*(1), 1–8. doi: 10.1515/ijfe-2012-0207.

WHELTON PK ET AL., 2018. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. J Am Coll Cardiol, *71*(19), e127–e248. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2013. A global brief on hypertension : silent killer, global public health crisis: World Health Day 2013.

WU H ET AL. (2014). Hydrolysis and purification of ACE inhibitory peptides from the marine microalga Isochrysis galbana. J Appl Phycol 27, 351–361 https://doi.org/10.1007/s10811-014-0347-x

WU J, ALUKO RE, & NAKAI S. 2006. Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure−Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. J Agric Food Chem, *54*(3), 732–738. doi: 10.1021/jf051263l

WU Q ET AL. (2016). Purification and characterization of two novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from R-phycoerythrin of red algae (Bangia fusco-purpurea). Eur Food Res Technol 243, 779–789. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2792-z

XIE J, CHEN X, WU J, ZHANG Y, ZHOU Y, ZHANG L, TANG YJ, & WEI D. 2018. Antihypertensive Effects, Molecular Docking Study, and Isothermal Titration Calorimetry Assay of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from *Chlorella vulgaris*. J Agric Food Chem, *66*(6), 1359–1368. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04294

ZHANG M, GUO J, HU X, ZHAO S, LI S, & WANG J. 2019. An *in vivo* anti-tumor effect of eckol from marine brown algae by improving the immune response. Food Funct, *10*(7), 4361–4371. doi: 10.1039/C9FO00865

CAPÍTULO II

PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I A PARTIR DA CIANOBACTÉRIA *Arthrospira platensis*

Gabrielly Hilário da Silva[1]
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa[2]
Ana Lúcia Figueredo Porto[3]
Raquel Pedrosa Bezerra[4]

[1] Mestre em Biociência Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
[2] Professor Adjunto do Departamento de Biologia Celular e Molecular Aplicada. Universidade de Pernambuco - UPE
[3] Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[4] Professora Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

RESUMO

A hipertensão é caracterizada por um aumento anormal dos níveis de pressão arterial e está relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Um dos mecanismos responsáveis pela homeostase pressórica é o complexo enzimático formado pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). *Arthrospira platensis (sin. Spirulina platensis)* é uma cianobactéria da família *Oscillatoriaceae* amplamente comercializada e estudada por apresentar propriedades químicas e biológicas de alto interesse em biotecnologia. Neste estudo, a biomassa de *A. platensis* foi submetida à digestão gastrointestinal *in vitro* para obter peptídeos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina-I (iECA). Após a digestão gastrointestinal *in vitro* utilizando sequencialmente as enzimas pepsina e pancretina a 37°C, o hidrolisado mostrou atividade de iECA de 56,47±0,22 e IC50=1.12±0,12 mg/mL. Em seguida, o hidrolisado foi ultrafiltrado gerando frações com atividades iECA de: < 3kDa = 90,43±0,89, 3-10kDa= 73,06 ±0,96 e >10kDa = 61,00±0,79. A fração < 3kDa demonstrou IC50= 0,001±0,36 mg/mL. A fração < 3kDa foi selecionada para o procedimento de purificação dos peptídeos iECA utilizando FPLC-Superdex G-75 e SOURCE™ RPC 3-mL como métodos cromatográficos. Após as etapas de purificação, 6 peptídeos foram identificados. O método RPC de fase reversa provou ser mais eficiente na separação dos peptídeos na faixa de gradiente linear 20-40% de acetonitrile contendo 0,1% de TFA. Estes resultados iniciais, apoiam o uso terapêutico potencial da *Arthrospira platensis* como fonte de peptídeos inibidores da ECA.

PALAVRAS-CHAVE: microalga; *Spirulina*; bioativo; hipertensão; *in vitro* digestão.

INTRODUÇÃO

A hipertensão é uma Doença Crônica Não-Transmissível (DCNT) definida por alterações nos níveis de pressão arterial sistólica (PAS) acima de ≥140 mmHg e níveis diastólicos acima de ≥90 mmHg, com fatores de risco relacionados à genética, idade, sobrepeso/obesidade, etnia e estilo de vida. Segundo a OMS, o número de adultos no mundo inteiro com hipertensão aumentou de 650 milhões para 1,28 bilhões nos últimos 30 anos (THE LANCET, 2021). O sistema renina-angiotensina (RAS) é uma via hormonal complexa que visa controlar os eletrólitos sanguíneos e regular os níveis de pressão arterial. Entre as principais enzimas desta via está a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela clivagem do decapeptídeo inativo angio-I no vasoconstritor octapeptídeo angio-II, que é o principal responsável pelos efeitos fisiológicos observados (ERDOS, 1976).

Uma das estratégias farmacológicas para o controle PAS é a inibição da ECA, sendo Captopril, Enalapril, Lisinopril e Benazepril algumas das drogas utilizadas na clínica de hipertensão (BARROSO et al., 2021). Embora eficazes, estas iECAs causam vários efeitos colaterais em pacientes crônicos, como tosse seca, edema angioneurotico, hiperpotassemia, agravamento da função renal na insuficiência renal e risco de malformação fetal em mulheres grávidas (BARROSO et al., 2021). Estratégias terapêuticas anti-hipertensivas naturais têm sido o alvo da busca para prevenir e tratar a HA, proporcionando eficiência no controle da pressão arterial e reduzindo os efeitos colaterais associados. A *Arthrospira platensis (sin. Spirulina platensis)* é uma cianobactéria da família *Oscillatoriaceae* amplamente comercializada e estudada por apresentar propriedades químicas e biológicas de alto interesse em biotecnologia. A grande disponibilidade de proteínas (cerca de 70% do peso seco), com inúmeros aminoácidos essenciais, vitaminas (complexo B; E, K são alguns), ácidos graxos polinsaturados essenciais, pigmentos, fibras e micronutrientes (minerais) a torna um "Superalimento", assim já considerado pela ONU e autorizado pela FDA (*Food and Drug Administration*), para consumo humano e animal (FAO, 2019).

Vários estudos corroboram com as propriedades biológicas presentes de *A. platensis* relacionadas com o tratamento ou prevenção de doenças, por exemplo, câncer (JIANG et al., 2018), diabetes (NASIRIAN et al., 2018), Alzheimer (TROTTA et al., 2022), Parkinson (TROTTA et al., 2022) e hipertensão (GHAEM FAR et al., 2021). No presente estudo, avaliamos a eficiência da digestão gastrointestinal simulada *in vitro* utilizando pepsina e pancreatina, sequencialmente, para a liberação de peptídeos anti-hipertensivos. Em seguida, foram identificados quanto a sua atividade inibidora da ECA e pureza.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

A cianobactéria *Arthrospira platensis* (UTEX 1926) foi adquirida da Coleção de Cultura de Algas da Universidade do Texas (AUSTIN, TX). A enzima pepsina e pancreatina da mucosa gástrica de porco, enzima conversora de angiotensina I (ACE; EC 3.4.15.1) do pulmão de coelho, substrato da enzima conversora de angiotensina I (ACE) hidrato de hippuril-histidyl-leucina (HHL) e bile de bovino e ovino foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Chemical Co*. (TEMECULA, CA, EUA). Acetonitrila para HPLC foi obtida da *LiChrosolv®, Ltda*. (DARMSTADT, ALEMANHA). Ácido trifluoroacético da *Sigma-Aldrich Chemical Co*. (TEMECULA, CA, EUA). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico. O sistema e as membranas de ultrafiltração (UF) foram adquiridos da *Millipore Co* (BEDFORD, MA, EUA). A água deionizada foi obtida através do sistema de purificação e filtração de água Milli-Q com uma resistividade de 18 MΩ.cm (MILLIPORE, BEDFORD, MA, EUA).

CONDIÇÕES DE CULTURA

A cianobactéria *A. platensis* foi cultivada autotroficamente em meio líquido padrão Schlosser (SCHLOSSER, 1982). As culturas em frascos de Erlenmeyer foram submetidas a agitação contínua em shaker a 90 rpm, e temperatura de 30±2°C e intensidade de luz de 50 ± 5 µmol fotões $m^{-2}s^{-1}$ durante 13 dias. As células obtidas no final da fase exponencial de crescimento celular foram liofilizadas usando equipamento a vácuo *Christ Alpha 1-4 LD Plus* a temperatura de -28°C, pressão de 0,47 mbar durante 48 horas, para as seguintes etapas experimentais.

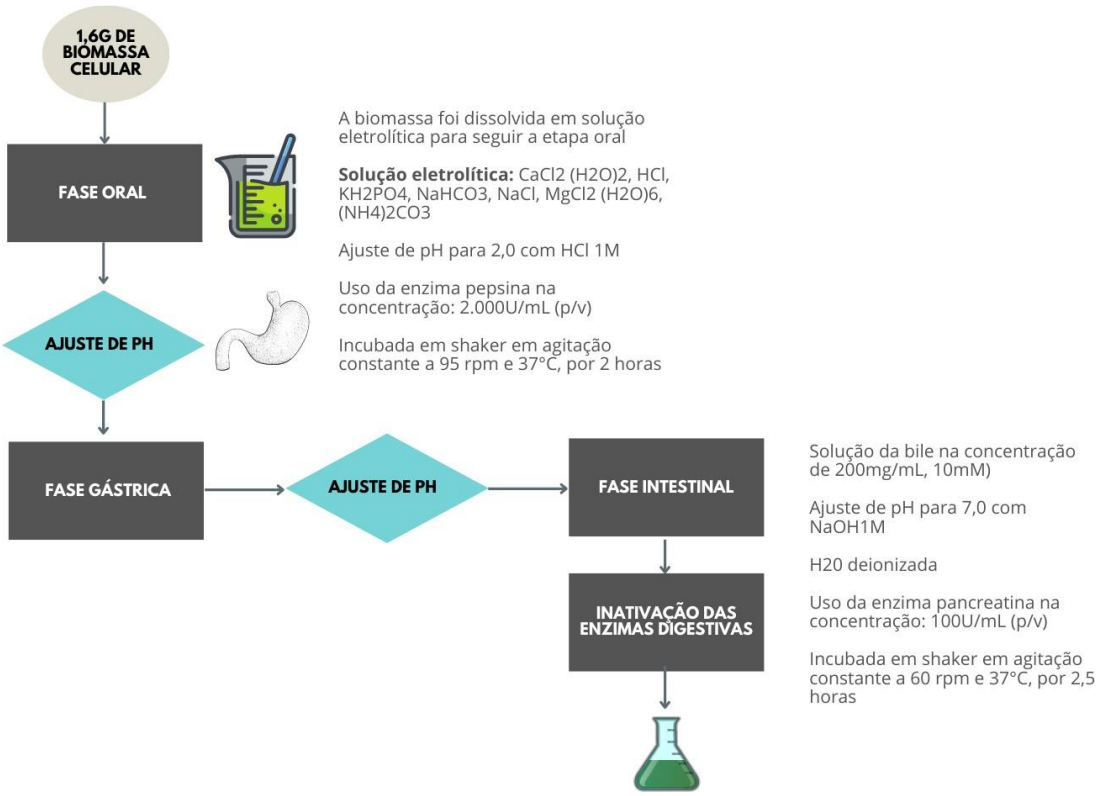
DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *in vitro*

A biomassa em pó de *A. platensis* foi pesada a 1,6g e submetida a digestão gastrointestinal simulada *in vitro* de acordo com o método descrito em Brodkorb et al., (2019), com algumas modificações. O pó liofilizado de *A. platensis* na proporção 1:1 (p/p) foi ressuspenso em solução

eletrolítica oral simulada (SSF) na concentração total de 1,5mM. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1M e a enzima pepsina na concentração 2.000 U/mL, solução de reserva de eletrólito e água deionizada foi adicionada e então, incubada sob constante agitação de 95 rpm em shaker com temperatura controlada por 2 horas a 37°C, para iniciar a fase gástrica.

Após as 2 horas de reação, a solução biliar (C= 200mg/mL a 10mM), enzima pancreatina (C= 100 U/mL) e água deionizada foi adicionada para ajustar o pH a 7,0 com NaOH 1M, em seguida, incubada novamente sob agitação constante em shaker a 60 rpm (a 37°C por 2,5 horas). No final da fase intestinal, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 100°C para inativação das enzimas gastrointestinais. Após o aquecimento, os hidrolisados foram transferidos para um banho de gelo por 10 minutos. Os peptídeos foram separados por ultrafiltração utilizando membrana com tamanho < 3KDa por centrifugação (8.000 rpm durante 40 min) e depois ressuspendidos em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) para então verificar atividade anti-hipertensiva e para estimar a concentração de peptídeo/proteína. O processo é demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1. Processo de digestão gastrointestinal *in vitro.*



Adaptado: Autora (2022).

PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DA *Arthrospira platensis* (AP-3)

O hidrolisado da cianobactéria *A. platensis* obtido da simulação da digestão gastrointestinal com pepsina e pancreatina, foi fracionado com uma membrana de tamanho 3kDa. Todo o sobrenadante obtido foi liofilizado e avaliado para atividade inibitória da ECA. O grau de inibição da fração 3kDa foi calculado de acordo com o método descrito em Sangsawad et al. (2017). As concentrações de proteínas e peptídeos foram determinadas usando o Kit de Ensaio de Proteína BCA Pierce™. A fração < 3kDa foi aplicada à FPLC-Superdex *Fast Flow Column* G-75 HR10/300GL (1,0 cm × 80 cm) (FPLC ÄKTA; Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). A eluição foi realizada a uma vazão de 0,5 mL/min e a absorvância foi verificada a 215 nm.

Os quatro picos obtidos foram agrupados, concentrados e reaplicados em SOURCE™ RPC 3-mL coluna de fase reversa (6,4 × 100 mm) (GE HEALTHCARE, PISCATAWAY, NJ, EUA). A eluição foi realizada utilizando a fase móvel A (DI água contendo 0,1% (v/v) TFA) e a fase móvel B (ACN contendo 0,1% (v/v) TFA). A eluição por gradiente começa com 0-20% da fase móvel B durante 10 minutos e 20-100% durante 20 minutos a uma taxa de fluxo de 1mL/min. A eluição foi monitorada a 215 nm e foram coletadas frações de 1mL. A purificação foi repetida seis vezes. Os picos da fase móvel apareceram nos primeiros 6 minutos e os minutos 23 e 24. Os peptídeos foram coletados separadamente, liofilizados e avaliados para concentração de peptídeos e atividade de inibição da ECA. Foi verificada a IC50 da fração com a maior taxa de inibição da ECA.

ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I

A atividade anti-hipertensiva foi realizada usando a metodologia de Cushman & Cheung (1971) e Sangsawad et al (2017) com modificações. As amostras foram testadas para avaliar o grau de inibição da ECA usando como parâmetro a liberação de hippuril-histidyl-leucina (HHL, SIGMA-ALDRICH), que é seu substrato. Para cada ensaio, 50 µl da solução de hidrolisado com 50 µl de solução de ECA (0,33 U/ml) foram pré-incubados em 37˚C durante 5 min e depois incubados com 150 µl de substrato (8,3 mM HHL em tampão de hepes 100 mM com 500mM NaCl a pH 8,3 em 37˚C, durante 60 min). A reação foi terminada com a adição de 250 µl de HCl 1 M. O ácido hippúrico foi extraído com 1500 µl de acetato de etila por evaporação em um banho de água em 100˚C.

O resíduo foi dissolvido em 1mL de água destilada e filtrado com uma membrana de 0,45µm. A leitura da amostra foi medida a 228 nm usando espectrofotômetro. O grau de inibição das amostras foi avaliado contra o controle (ACE + HHL) sendo a referência para 100% de atividade, controle positivo (água DI + peptídeo), controle negativo (HCl + enzima + peptídeo) e o teste (amostra + ACE). Para o controle positivo foi utilizado Captopril® a uma concentração de 25 mg/mL.

$$\text{Atividade de inibição da ECA (\%)} = \left[\frac{(CONTROLE - CONTROLE\ BRANCO) - (TESTE - BRANCO)}{(CONTROLE - BRANCO\ TESTE)}\right] . 100$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados em triplicata foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), e comparações de meios pelo teste Duncan com a diferença com um intervalo de confiança de 95%, usando o software Statistica ®, versão 10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ECA DAS FRAÇÕES DA *Arthrospira platensis*

Digestão gastrointestinal (DGI) da *A. platensis* usando sequencialmente as enzimas pepsina e pancreatina a 37°C produziram peptídeos com atividade inibitória da ECA (iECA) (%) de 56.47±0,22 na amostra não fracionada. O IC50 da amostra não-fracionada após a DGI foi de 1.12±0,12 mg/mL (**Tabela 1**). O hidrolisado foi ultrafiltrado usando membranas com tamanho de < 3kDa, 3-1,0kDa e >10kDa, respectivamente, obtendo as frações para realizar a atividade iECA. A fração < 3KDa (AP-3) demonstrou um aumento significativo na atividade iECA (%) de peptídeos da *A. platensis* com um valor de 90,43±0,89 superando o controle positivo captopril com atividade iECA (%) de 84.43±0,61. O IC50 foi de 0.001±0,36 mg/mL (**Tabela 1**).

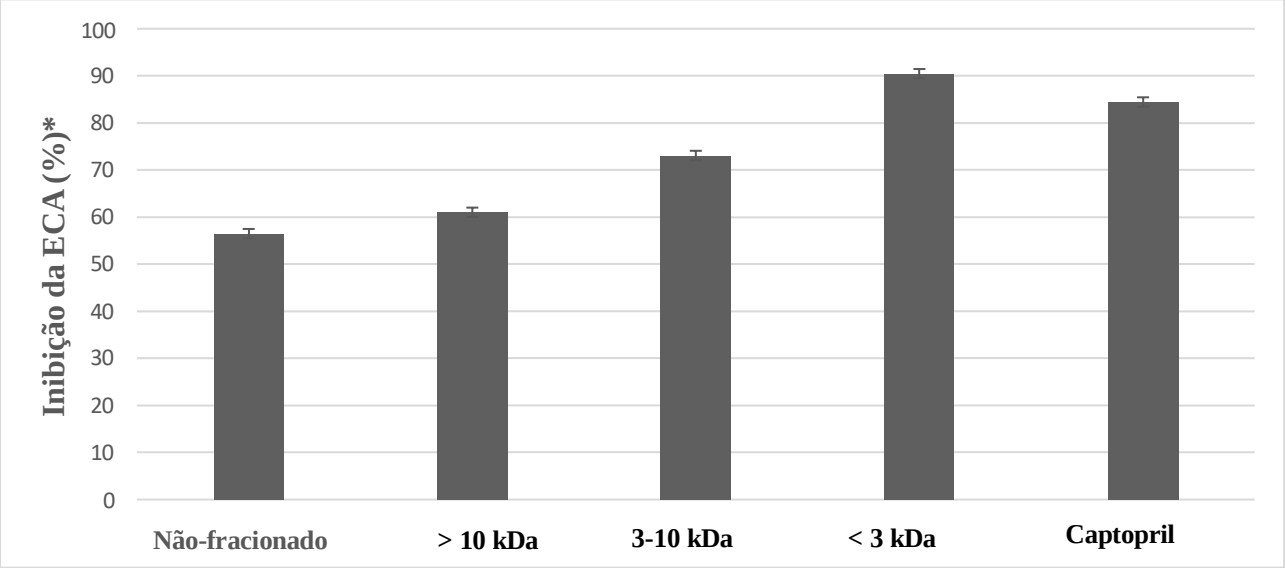
A fração AP-3 foi selecionada para proceder com a purificação dos peptídeos iECA. Os peptídeos bioativos com baixo peso molecular têm a vantagem de serem capazes de atravessar a barreira gastrointestinal sem serem tão facilmente suscetíveis à ação de enzimas proteolíticas, preservando assim sua integridade e atividade biológica. Além disso, podem ser altamente específicos, com baixa toxicidade e acúmulo de tecidos, grande espectro de ação terapêutica e diversidade estrutural (MARX, 2005; ROBBERTS et al., 1999). O método de hidrólise enzimática com pepsina e pancreatina, sequencialmente, manteve a atividade iECA em todas as frações separadas por ultrafiltração, indicando que é um método eficiente e específico, podendo acrescentar às formulações farmacológicas e/ou nutracêuticas para pacientes hipertensos.

Tabela 1. Atividade inibitória em diferentes pesos moleculares do hidrolisado pós-digerido da cianobactéria *A. platensis*

Fração	Taxa de inibição (%)	IC_{50} (mg/mL)
Não-fracionado[2]	56.47±0.22	1.12±0.12
> 10 kDa[2]	61.00±0.79	-
3-10 kDa	73.06 ±0.96	-
< 3 kDa	90.43±0.89	0.001±0.36
Captopril	84.43±0.61	-

A taxa de inibição e os valores de IC50 foram determinados em triplicata em experimentos individuais. [1]IC50 é a concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade da ECA. [2] Hidrolisado pós-digerido. [3]Membrana de UF (peso molecular de 3 e 10 kDa foram utilizadas). ECA, enzima conversora de angiotensina. DGI, Digestão gastrintestinal.

Figura 2. Atividade inibitória da Enzima Conversora de Angiotensina-I em porcentagem das frações < 3kDa (AP-3).



*O rendimento do hidrolisado foi calculado como referido em Métodos. Os valores são a média ± SD (n = 3).

PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS IECA DA *A. platensis*

Os peptídeos inibidores de ECA foram purificados a partir do cianobactéria *A. platensis* usando métodos combinados FPLC-Superdex G-75 e SOURCE™ RPC 3-mL cromatografia em coluna de fase reversa (GE Healthcare). A **figura 3** mostra 6 picos de absorção a 215 nm. As frações associadas com os picos foram agrupadas e liofilizadas para avaliar a atividade iECA. As frações com maior atividade específica foram separadas por 3-mL SOURCE™ RPC em sistemas de projeto ÄKTA™ (GE HEALTHCARE, PISCATAWAY, NJ, EUA) com gradiente linear 20-40% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA. O perfil de eluição dos picos é ilustrado na **Figura 4**.

Alguns autores corroboram que para ser considerado um inibidor com alta especificidade e, consequentemente, alta atividade específica iECA, os valores de IC50 devem ser inferiores a 0,1mg/mL, e para atividade moderada, entre 0,1 e 0,5mg/mL (WU and DING, 2002; HYUN and SHIN, 2000). A fração < 3kDa obteve um resultado de IC_{50} considerado com alta atividade de inibição da ECA quando comparado com o não-fracionado neste estudo. Os autores relataram que peptídeos menores que 5kDa iECA obtidos por hidrólise da *Chlorella elipsodeia* resultaram em IC_{50}= 0,89 mg/mL (Ko et al., 2012). Paiva et al. (2016) hidrolisado com enzimas digestivas *U. rigida* para peptídeos iECA menores que 1kDa e resultou em IC50 de 0,095 mg/mL. A *Spirulina sp.* após ser

hidrolisada com pepsina, tripsina e quimotripsina produziu peptídeos iECA menores que 5kDa com valor IC50 de 0,66±0,03 mg/mL (Heo et al., 2017).

Figure 3. Purificação de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina-I do hidrolisado da cianobactéria *A. platensis* digerida com as enzimas pepsina e pancreatina. Eluição da fração AP-3 (< 3kDa) com Tris-HCl (0,1M) em coluna de gel filtração Superdex G75.

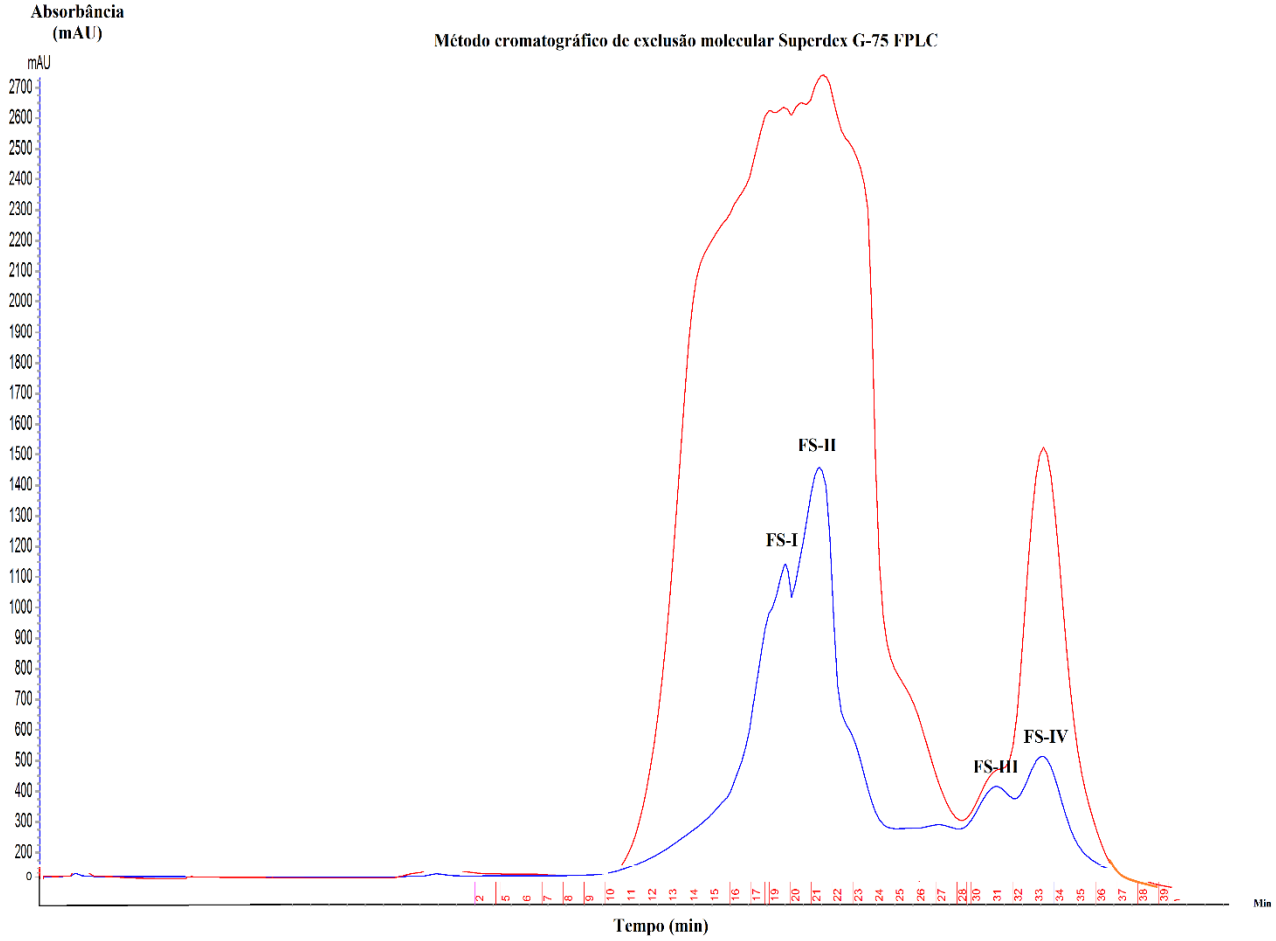
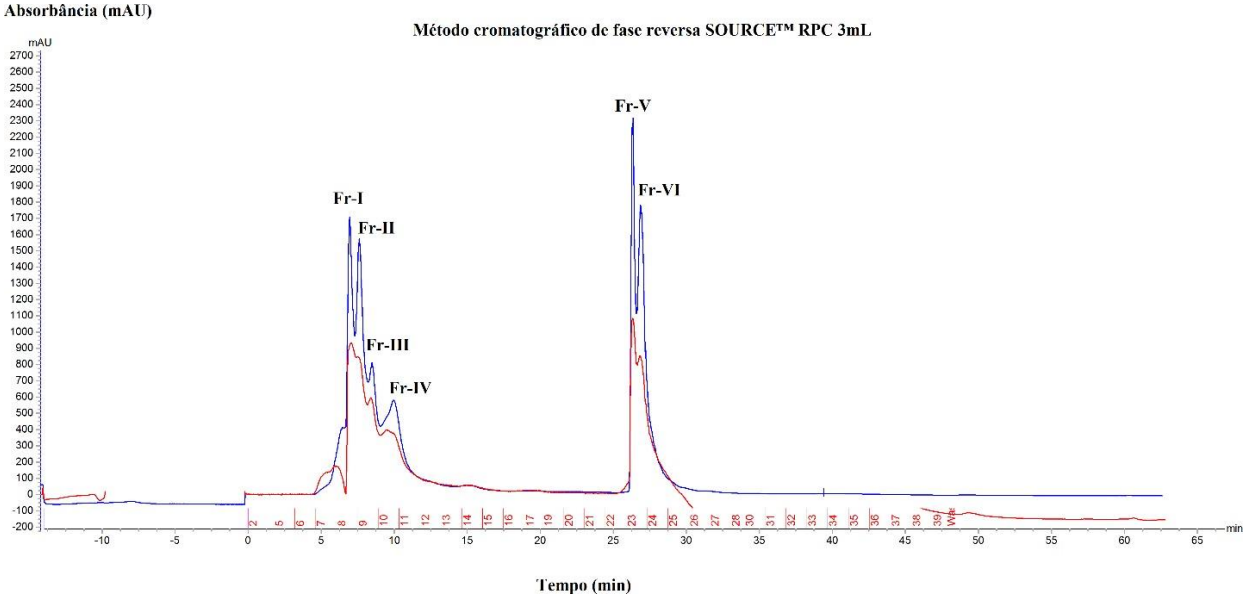


Figure 4 – Purificação de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina-I do hidrolisado da cianobactéria *A. platensis* digerida com as enzimas pepsina e pancreatina. Eluição da fração AP-3 (Superdex-G75) com acetonitrila em TFA 0,1% em coluna de fase reversa RP – FPLC.



CONCLUSÃO

As cianobactérias, especialmente *Arthrospira platensis*, têm sido pouco exploradas para produzir peptídeos anti-hipertensivos. Este estudo demonstrou que a hidrólise seqüencial com as enzimas pepsina e pancreatina sob condições fisiológicas simuladas *in vitro*, pode produzir peptídeos inibidores da ECA com alta atividade específica. Seis peptídeos iECA foram purificados a partir do hidrolisado pós-digerido utilizando membranas de ultrafiltração e métodos cromatográficos seqüenciais, sugerindo o potencial uso como matéria-prima para drogas ou ativos nutracêuticos para a prevenção/tratamento da hipertensão, oferecendo uma alternativa natural e inovadora em comparação com as terapias sintéticas existentes atualmente.

AGRADECIMENTOS

Reconhecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Processo 88887.785013 / 2020-00, Código Financeiro 001) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e as bolsas de estudo.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO ET AL. Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial – 2020. Arq Bras. Cardiol., v. 116, n. 3. P. 516-658, mar. 2021.

BRODKORB, André et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. Nature protocols, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.

CUSHMAN, David W.; CHEUNG, Hongson S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochemical pharmacology, v. 20, n. 7, p. 1637-1648, 1971.

ERDÖS, Ervin G. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. The American journal of medicine, v. 60, n. 6, p. 749-759, 1976.

GHAEM FAR, Zohreh et al. Antihypertensive and antihyperlipemic of spirulina (Arthrospira platensis) sauce on patients with hypertension: A randomized triple-blind placebo-controlled clinical trial. Phytotherapy Research, v. 35, n. 11, p. 6181-6190, 2021.

HEO, Seong-Yeong et al. A heptameric peptide purified from Spirulina sp. gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme-and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells. International journal of molecular medicine, v. 39, n. 5, p. 1072-1082, 2017.

HYUN, Chang-Kee; SHIN, Heuyn-Kil. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 65-71, 2000.

JIANG, Liangqian et al. C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. **Cancer cell international**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2018.

KO, Seok-Chun; KIM, Daekyung; JEON, You-Jin. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine Chlorella ellipsoidea protein against free radical-induced oxidative stress. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2294-2302, 2012.

MARX, V. Watching peptide drugs grow up. **Chem. Eng. News**, v. 83, p. 17-24, 2005.

NASIRIAN, Fariba et al. Effects of Spirulina platensis microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 11, p. 375, 2018.

PAIVA, Lisete et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Ulva rigida C. Agardh protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 65-76, 2016.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 4, p. 459-476, 2002.

SANGSAWAD, Papungkorn; ROYTRAKUL, Sittiruk; YONGSAWATDIGUL, Jirawat. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked chicken breast. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 77-83, 2017.

TROTTA, Teresa et al. Beneficial effects of spirulina consumption on brain health. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 676, 2022.

WU, Jianping; DING, Xiaolin. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food research international**, v. 35, n. 4, p. 367-375, 2002.

CAPÍTULO III

PRODUTO ANTI-HIPERTENSIVO FORMADO POR PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS OBTIDOS DA BIOMASSA DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES

[1]Gabrielly Hilário da Silva
[2]Raquel Pedrosa Bezerra
[3]Ana Lucia Figueiredo Porto
[4] Karoline Mirella Soares de Souza
[5]Andreza Pereira de Amorim
[6]Romero Marcos Pedrosa Brandao Costa

[1] Mestre em Biociência Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
[2] Professora Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[3] Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[4] Doutoranda em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UFPE
[5] Licenciada em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[6] Professor Adjunto do Departamento de Biologia Celular e Molecular Aplicada. Universidade de Pernambuco - UPE

Número do Processo de depósito: BR 10 2021 013693 6

RESUMO

A presente invenção refere-se à um produto constituído por peptídeos anti-hipertensivos extraídos de microrganismos fotossintetizantes presentes na biomassa celular hidrolisada ou peptídeos purificados encapsulados em biopolímero com propriedades relacionadas a biodegradação, baixa toxicidade e biocompatibilidade, servindo como uma possível alternativa natural para o tratamento anti-hipertensivo em humanos e animais. Os encapsulados anti-hipertensivos podem ser aplicados como aditivos alimentares, suplementação nutracêutica ou como matéria-prima para formulações farmacêuticas.

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

12/07/2021 870210062907 14:25
29409161935362436

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 013693 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 24416174000106
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 52171-900
País: Brasil
Telefone: (81) 332 06104
Fax: (81) 332 06001
Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUTO ANTI-HIPERTENSIVO FORMADO POR PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS OBTIDOS DA BIOMASSA DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES

Resumo: PRODUTO ANTI-HIPERTENSIVO FORMADO POR PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS OBTIDOS DA BIOMASSA DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES. A presente invenção refere-se à um produto constituído por peptídeos anti-hipertensivos extraídos de microrganismos fotossintetizantes presentes na biomassa celular hidrolisada ou peptídeos purificados encapsulados em biopolímero com propriedades relacionadas a biodegradação, baixa toxicidade e biocompatibilidade, servindo como uma possível alternativa natural para o tratamento anti-hipertensivo em humanos e animais. Os encapsulados anti-hipertensivos podem ser aplicados como aditivos alimentares, suplementação nutracêutica ou como matéria-prima para formulações farmacêuticas.

CAPÍTULO IV

A CIANOBACTERIA *Arthrospira platensis* COMO FONTE DE PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVOS

[1] Gabrielly Hilário da Silva
[2] Andreza Pereira Amorim
[3] Yanara Alessandra Santana Moura
[4] Karoline Mirella Soares de Souza
[5] Ana Lucia Figueiredo Porto
[6] Raquel Pedrosa Bezerra

[1] Mestre em Biociência Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[2] Licenciada em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[3] Graduanda do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE
[4] Doutoranda em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UFPE
[5] Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[6] Professora Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Publicado em E-book Ciências da Vida, Vol. II, págs. 20-34.

RESUMO

Peptídeos bioativos têm gerado numerosos benefícios à saúde humana. Em particular, os peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) têm mostrado atividade promissora para o controle da hipertensão, visto que essa enzima é uma das principais envolvidas no controle da pressão arterial. Fontes de origem animal, vegetal, e mais recentemente, os microrganismos fotossintetizantes têm sido explorados para obtenção desses peptídeos. Um dos microrganismos fotossintetizantes em destaque para obtenção de peptídeos inibidores da ECA (iECA) é a cianobactéria *Arthrospira platensis*, uma vez que em sua composição nutricional há alta quantidade de proteínas, podendo atingir até 70% do seu peso seco. Diante disso, este capítulo apresenta uma visão geral do potencial da *A. platensis* como uma fonte de peptídeos iECA.

PALAVRAS-CHAVE: Bioativos. Enzima conversora de angiotensina. Hipertensão. Inibidores.

CIÊNCIAS DA SAÚDE
APRENDIZADOS, ENSINO E PESQUISA NO CENÁRIO CONTEMPORÂNEO
VOLUME II

CAPÍTULO II

CIANOBACTÉRIA ARTHROSPIRA PLATENSIS COMO FONTE DE PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVO

DOI: 10.51859/ampla.csa528.2121-2

Andreza Pereira de Amorim [1]
Yanara Alessandra Santana Moura [2]
Gabrielly Hilário da Silva [3]
Karoline Mirella Soares de Souza [4]
Ana Lúcia Figueiredo Porto [5]
Raquel Pedrosa Bezerra [6]

CAPÍTULO V

Arthrospira sp. (sin. Spirulina sp.) E C-FICOCIANINA COMO SUPLEMENTO NUTRACÊUTICO NEFROPROTETOR EM DOENÇAS RENAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE

[1]Gabrielly Hilário da Silva
[2]Leucio Duarte Vieira Filho
[3]Ana Lucia Figueiredo Porto
[4]Raquel Pedrosa Bezerra

[1] Mestre em Biociência Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[2] Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
[3] Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[4] Professora Adjunta do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

RESUMO

Arthrospira (sin. Spirulina) é um cianobactéria verde-azulada considerada pela ONU como um "superalimento" do futuro. O pigmento fotossintético ficocianina (incluído no grupo das ficobiliproteínas) presente na *Spirulina*, tem sido associado como uma fonte potencial de bioativos com propriedades nefroprotetoras. Assim, esta revisão quantitativa propõe resumir os efeitos do consumo de *Spirulina* ou ficocianina isolada ou associada a outros ingredientes ativos sobre a resposta dos biomarcadores da função renal. Buscas sistemáticas das bases de dados MEDLINE, Web of Science, LILACS, ScienceDirect e CENTRAL até maio de 2022 foram pesquisadas. Os modelos de efeito aleatório e de inverso da variância foram aplicados para verificação dos dados e realização da meta-análise. Para avaliação de qualidade e risco de viés, foram utilizadas a ferramenta RoB para estudos de intervenção animal (SYRCLE's RoB tool) e Colaboração *Cochrane*. Um total de 267 estudos foi encontrado e após a triagem 10 foram selecionados para prosseguir com as análises. Os resultados indicaram que o consumo de *Spirulina* ou ficocianina induziu efeitos na diminuição dos níveis de creatinina sérica (mg/dL) (DM: 0,33; 95% CI: 0.60 a 0.07; P=0,012), ácido úrico (DM: 1,20; 95% CI 2,28 a 0,11, P=0,03), uréia (DM:20,80; CI 13,10 a 28,50; P<0,001). Para proteinuria, não houve melhora (DM:1,36; 95% CI 2,18 a 0,54, P=0,001). Também diminuiu os níveis de PAS (mmHg) (DM:25,16; 95% CI 44,82 a 5,50, P 0,012). Estes resultados sugerem que o consumo de *Spirulina* ou ficocianina pode exercer efeitos nefroprotetores benéficos em contextos patológicos em modelos pré-clínicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Spirulinares; Oscillariales*; Anti-hipertensivos; Pressão arterial; Peptídeos bioativos; Nutracêuticos; Alimento functional; Suplemento alimentar.

INTRODUÇÃO

Arthrospira (sin. Spirulina) é um cianobactéria verde-azul com alta adaptabilidade em diferentes habitats devido a sua flexibilidade metabólica, com baixas exigências nutricionais e alta taxa de crescimento. A biomassa celular é considerada pelas Nações Unidas como "alimento do futuro" por conter um alto teor de proteínas (cerca de 70% do peso seco), minerais, beta-carotenos, vitaminas e pigmentos (ROSA, MORAES, CARDIAS, & COSTA, 2015). A biomassa celular e seus produtos são explorados comercialmente por vários setores industriais. Em 2019, a produção global anual de microalgas atingiu um total de 56.456 toneladas, dividida em 56.208 toneladas de *Arthrospira (sin. Spirulina)* e 248 toneladas de quatro microalgas verdes *(Haematococcus pluvialis, Chlorella vulgaris, Tetraselmis ,spp e Dunaliella salina)* (FAO, 2020a).

Esta biomassa é aplicada principalmente como alimentos funcionais ou suplementos alimentares, tais como (i) pigmentos como suplementos nutricionais (por exemplo carotenos de *Dunaliella* e astaxantina e cantaxantina de *Haematococcus*); (ii) ácido docosahexaenóico (DHA) de *Crypthecodinium*; (iii) polissacarídeos como aditivos de produtos cosméticos; e (iv) corantes alimentares naturais (por exemplo, *Spirulina* como corante alimentar natural azul) (FAO, 2020A; SPOLAORE et al, 2006; BARKIA, SAARI and MANNING, 2019).

A ficocianina é um pigmento fotossintético do grupo das ficocianobactérias, microalgas e macroalgas (ERIKSEN NT., 2008; GLAZER AN., 1994). É um pigmento abundante na composição celular da *Spirulina (Arthrospira) sp*. com concentrações que variam de 9,5 a 46,0% (p/p) (MARKOU & NERANTZIS, 2013). No setor industrial de alimentos, vários estudos corroboram o potencial das ficocianinas e outros compostos bioativos presentes na *Spirulina (Arthrospira)* com propriedades anticancerígenas, antivirais, atividades antibacterianas, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, anti-hipertensivas e controle da obesidade. Tais características conferem a potencialidade do uso da biomassa celular como alimento nutracêutico (ROMAY at al., 2003; FAROOQ et al., 2004; BESCO'S et al., 2008; NAYELLIMEMIJE-LAZARO et al., 2018; DENG et al., 2010; MARTÍNEZ-GALERO et al., 2016; GUTIÉRREZ-SALMEÁN G et al., 2015; KARKOS PD et al., 2011).

A hipertensão arterial (HA) é uma condição multifatorial associada a fatores genéticos e epigenéticos, cardio e metabólico renal (por exemplo, dislipidemia, obesidade abdominal, intolerância à glicose e diabetes *mellitus*), fatores ambientais e sociais, e é classificada como uma das doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) (BARROSO et al., 2020). Em 2019, a Carga Global de Doenças Cardiovasculares e Fatores de Risco (*Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors*)

relatou que aproximadamente 828 milhões de adultos com HA foram notificados em todo o mundo e estando relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), doenças renais crônicas (DRC), derrame e mortalidade precoce (BARROSO et al., 2020; ROTH, et al., 2020).

De acordo com as diretrizes estabelecidas pela *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*, a doença renal crônica é definida e caracterizada pela diminuição da função renal com uma taxa de filtração glomerular avaliada abaixo de 60mL/min por 1,73 m², medida de marcadores de dano renal ou ambos, durante pelo menos 3 meses (KIDNEY INT., 2021; WEBSTER et al., 2017). Estudos observacionais indicam uma relação entre hipertensão resistente com o desenvolvimento de insuficiência renal crônica e propõem que a pressão arterial sistólica (PAS) <140 mmHg reduz o risco de progressão da doença renal crônica e, portanto, falha dos rins (CSABA ET AL., 2014; SEAGHDHA et al., 2009; TOZAWA et al., 2003).

As estratégias recomendadas para o tratamento da hipertensão consistem em mudar o estilo de vida, os hábitos alimentares do paciente e a intervenção farmacológica. Há oito classes de anti-hipertensivos sintéticos utilizados na prática médica: tiazida ou diuréticos similares (DIU), bloqueadores dos canais de cálcio (BCCs), inibidores da enzima conversora angiotensina I (iECAs), bloqueadores dos receptores AT_1 da angiotensina II (BRAs), beta-bloqueadores (em condições específicas de controle da freqüência cardíaca (FC), angina, em combinação com outros medicamentos), simpaticoterapia central, bloqueadores alfa e vasodilatadores (LAW ET AL, 2009; THOMOPOULOS ET AL. , 2014; TURNBULL ET AL., 2003).

O uso contínuo de agentes anti-hipertensivos sintéticos tem demonstrado sérios efeitos colaterais em pacientes crônicos, como: hiperpotassemia em pacientes com insuficiência renal, especialmente em diabéticos, risco de complicações fetais (POLIFKA et al., 2012; LAUBE et al, 2007; BARROSO et al., 2020), exantema, broncoespasmo, bradicardia, distúrbios de condução atrioventricular, vasoconstrição periférica, insônia, pesadelos, depressão, astenia, reações auto-imunes como febre, anemia hemolítica, galactorréia e disfunção hepatica e aumento do risco de incidência de isquemia cardíaca (HF) (KAPLAN et al., 2015; BARROSO et al., 2020). Fontes naturais de bioativos anti-hipertensivos são alternativas potenciais para controlar a hipertensão e reduzir os efeitos colaterais associados com o tratamento de pacientes crônicos.

Há um número considerável de estudos pré-clínicos usando *Spirulina* no tratamento da hipertensão arterial (PAN et al., 2015; ZHENG et al., 2017; CARRIZZO et al., 2019). Estudos clínicos avaliando o potencial nutracêutico das espécies de cianobactérias e microalgas, especialmente *Arthrospira sp.* são atualmente escassos, sobretudo, em relação ao controle da hipertensão (SULIBURSKA et al., 2016; MICZKE et al., 2016). Neste contexto, este trabalho avalia o efeito do consumo de *Arthrospira (sin. Spirulina)* e C-ficocianina na prevenção da hipertensão e das doenças

renais. Para isso, realizamos uma revisão sistemática e uma meta-análise de estudos pré-clínicos randomizados para avaliar os efeitos renoprotetores da *Spirulina ou Arthrospira sp*. ou C-ficocianina consumida individualmente ou em combinação com outros ingredientes ativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

PROTOCOLO E DIRETRIZES

O protocolo para este estudo foi preparado com base no Manual e Relatório da *Cochrane* e nas diretrizes encontradas no PRISMA (HIGGINS JPT *et al*., 2021). Os detalhes do protocolo para esta revisão sistemática foram registrados no PROSPERO e podem ser acessados em www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/display_record.asp?ID= CRD42022358264.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos estudos que apresentaram:

- Todos os modelos animais com hipertensão experimental ou/e doenças renais; todas as espécies e todos os sexos;
- Tratamento utilizando *Spirulina*, *Arthrospira* ou C-ficocianina isolados ou em combinação com ingredientes ativos alternativos para o tratamento de doenças renais e/ou hipertensão; com pelo menos duas semanas de intervenção;
- Uso de grupo placebo com solução salina, grupo sham, grupo controle positivo com drogas conhecidas na prática clínica;
- Estudos pré-clínicos randomizados utilizando grupos de todos os sexos;
- Concentrações séricas de creatinina, uréia, ácido úrico e proteinúria. Além dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos estudos que apresentavam:

- Animais com co-morbidades;
- Modelos *ex vivo, in vitro e in silico*;
- Tempo de intervenção inferior a duas semanas;

- Todas as outras condições de controle;
- Ausência de um grupo de controle ou placebo;
- Estudos com outros desenhos que não ensaios pré-clínicos randomizados;
- Ausência de média e desvio padrão dos resultados relativos aos níveis de SDB e DBP, creatinina sérica, ácido úrico, uréia e proteínas totais.

ESTRATÉGIA DE BUSCA

A pesquisa foi realizada nos bancos de dados MEDLINE, LILACS, *ScienceDirect*, CENTRAL Cochrane e Web of Science. Os descritores *Spirulina, Arthrospira*, C-ficocianina, hipertensão, doença renal, inibidores da ECA e todos os sinônimos encontrados nas bases de dados *Medical Subject Headings e Descriptors in Health Sciences* foram usados na busca. Foram incluídos estudos publicados nos anos de 2011 a 2022 e escritos em inglês. Os estudos foram triados e selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade descritos.

DADOS OBTIDOS DOS ESTUDOS

Os dados obtidos dos estudos consistiram em:

- Uso de grupo de controle e/ou placebo e grupo experimental randomizado;
- O tipo de doença renal, espécie, sexo, peso corporal;
- Uso de *Spirulina, Arthrospira* ou C-ficocianina isolados ou em combinação com outro ingrediente ativo;
- Dose e via de tratamento utilizada;
- Esquema de tratamento, tempo, forma de administração (oral, pericutânea), veículo;
- Concentrações de creatinina, ácido úrico, uréia e proteínas totais.
- Níveis de SDB e DBP;
- Autor, ano, país e idioma.

ANÁLISE DA QUALIDADE METODOLÓGICA E RISCO DE VIÉS

A avaliação do risco de viés foi elaborada a partir da presença ou não de indicações na geração da seqüência de estudos, características da linha de base, ocultação de alocações, alojamento aleatório, cegamento, avaliação aleatória de resultados, resultados incompletos, seleção no relatório de resultados e outras fontes de viés consideradas. Para esta etapa, todos os autores revisores contribuíram para a verificação dos estudos de acordo com os critérios mencionados anteriormente. Os critérios de avaliação específicos para estudos pré-clínicos com animais foram elaboradas segundo a ferramenta SYRCLE's.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa *Review Manager* v. 5.4, com desfecho contínuo, método estatístico de variância inversa, análise por modelo de efeitos aleatórios, medição do efeito por diferença da média e intervalo de confiança de 95% (IC), foi utilizado para a meta-análise e ordenação dos estudos por peso. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

As estratégias e procedimentos de pesquisa dos estudos estão descritos no diagrama da **figura 1**. A função renal foi avaliada usando os biomarcadores da função renal creatinina sérica, ácido úrico, uréia e proteinúria em mg/dL e pressão sistólica (mmHg) em ratos adultos expostos à *Spirulina*, *Artrospira* ou tratamento com C-ficocianina isolados ou combinados com outros ativos. Entre os dez estudos selecionados para análise, quatro estudos utilizaram biomarcadores de creatinina sérica de função renal (mg/dL), ácido úrico (mg/dL) e uréia (mg/dL) ou proteinúria total (mg/dL) e quatro estudos utilizaram três biomarcadores (creatinina sérica (mg/dL) ácido úrico (mg/dL) ou uréia (mg/dL), enquanto apenas dois estudos utilizaram resultados médios da PAS (%), o que demonstra que a maioria dos estudos avalia os principais biomarcadores de função renal (Tabelas 1A-E, material suplementar).

Os resultados em concentração (mg/dL) de biomarcadores de função renal e pressão arterial sistólica (%) em mmHg e I^2 desta meta-análise estão indicados nas tabelas 2A-E. A avaliação do risco de viés foi elaborada a partir da presença ou não de indicações nos estudos referentes à randomização, ocultação da randomização, cegueira dos participantes, cegueira dos avaliadores, resultados incompletos, seleção no relatório de resultados e outras fontes de viés consideradas. Todos os estudos avaliados apresentaram evidências baixas ou pouco claras de risco de viés, com base nos critérios citados.

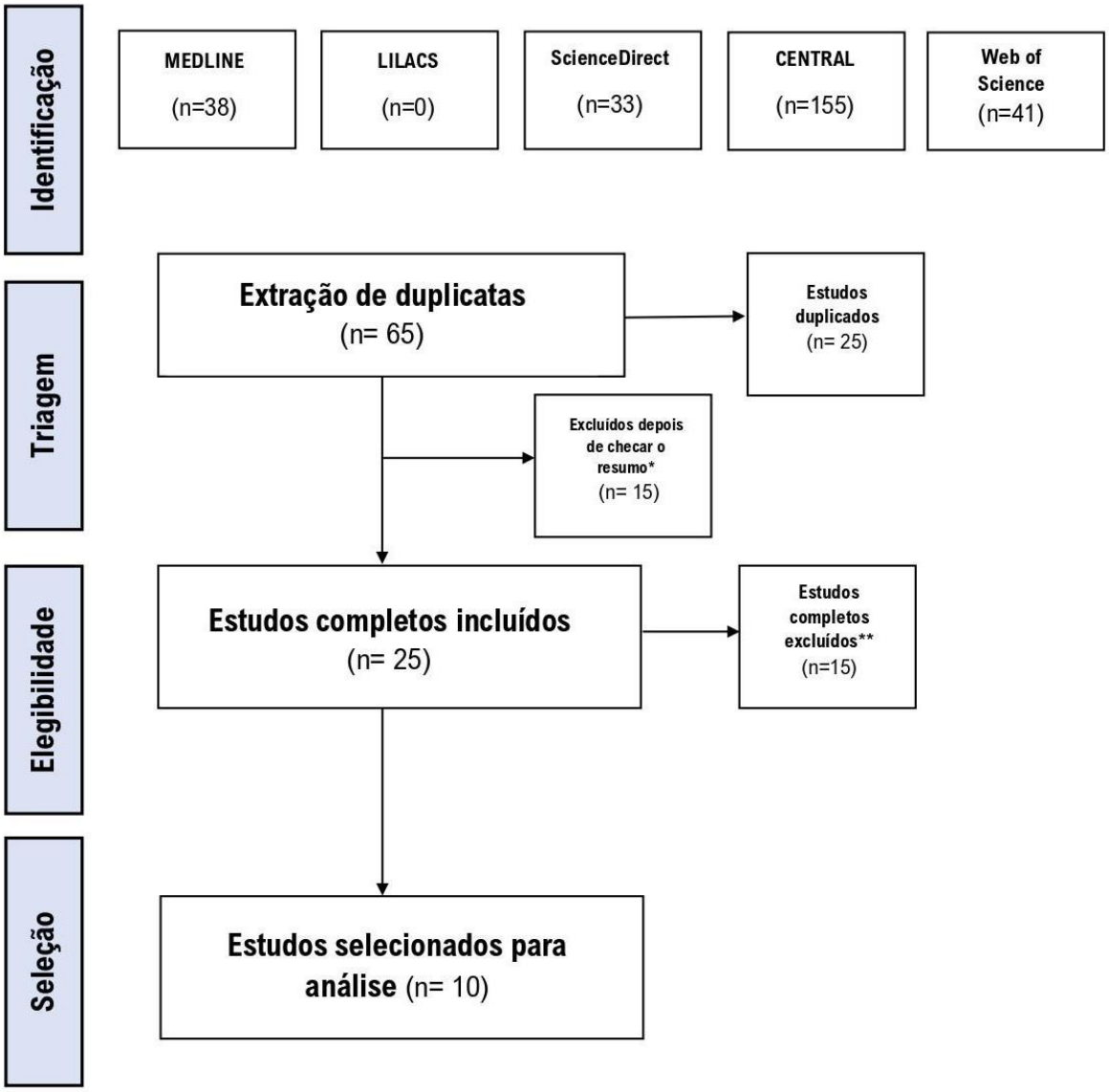


Figura 1. Diagrama de fluxo dos estudos (Prism 8.0.1 2018). *Excluído por não atender aos critérios de inclusão. **Excluído por não apresentar média e desvio padrão para os resultados quantitativos dos biomarcadores de função renal.

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *Arthrospira* (*sin. Spirulina*) OU C-FICOCIANINA NA CONCENTRAÇÃO DE CREATININA SÉRICA (CS)

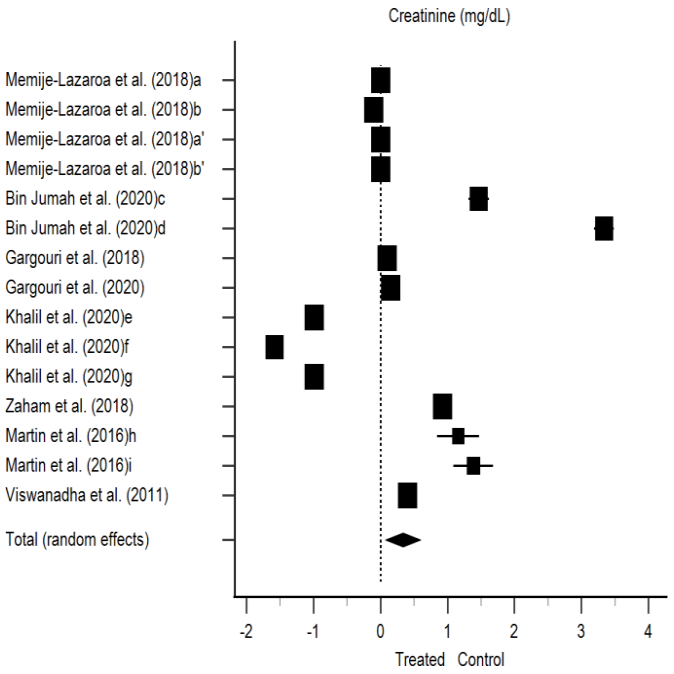
Para doenças renais crônicas, a suplementação por 5 semanas com *Spirulina* (1g/kg p.b./dia) ou C-ficocianina (100mg/kg p.b./dia) não demonstrou uma diferença em CS entre os grupos controle e tratado (MEMIJE-LAZARO et al., 2018). O consumo de *Spirulina platensis* (300 mg/kg p.b./dia, dissolvido em água destilada) + Furan (16 mg/g p.b./dia, dissolvido em óleo de milho Mazola) para proteção do tecido renal contra intoxicação furânica por 4 semanas agravou a resposta de SC no grupo tratado (KHALIL et al., 2020 e, f, g). O consumo de 1000mg/kg p.b./dia + Acrilamida (20 mg/kg/dia) comparado a 500mg/kg p.b./dia + Acrilamida (20 mg/kg/dia) de *Spirulina platensis* por 5 semanas foi mais eficiente em resposta à SC e proteção renal contra intoxicação por acrilamida (BIN JUMAH et al., 2020c, d). A nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb pelo consumo de *Spirulina platensis* teve uma leve melhora em CS quando a dose foi alterada de 5,3g/kg de b.w/dia + 6g/L Pb acetato através da água potável para 1,5g/kg de b.w/dia + 6g/L Pb acetato através da água potável por 4 semanas (GARGOURI et al., 2018; GARGOURI et al., 2020c).

Consumo de extrato de *Spirulina platensis* (500 mg/Kg Pb/dia, dissolvido em solução salina) + 0,5mg de nicotina (base/kg pb/dia) por 4 semanas melhorou significativamente os níveis de CS mediado por estresse oxidativo induzido pela nicotina (ZAHAM et al., 2018). Na proteção renal em estresse oxidativo, o consumo de *Spirulina fusiformis* a 800 mg/kg c.v./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.b./dia durante 4 semanas teve uma melhora moderada nos níveis de CS (MARTIN et al., 2016h, i). O consumo de *Spirulina* (500 mg/kg p.b./dia) por 2 semanas para proteção em 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) induziu nefrotoxicidade teve uma baixa resposta nos níveis de SC no grupo tratado (VISWANADHA et al., 2011) (Tabela 1-A, material suplementar).

A meta-análise dos estudos indicou que administração de *Arthrospira (sin. Spirulina*) ou ficocianina teve um baixo efeito nos níveis de creatinina sérica (0,33; IC: 95% 0,60 a 0,07; P=0,012) com base nos 15 subgrupos analisados. O grau de heterogeneidade foi I^2 de 99,84% ($P < 0.0001$) (Tabela 2-A).

Tabela 2-A. Sumário dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou C-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal creatinina sérica (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise.

	Controle			Tratado				
Estudos ou subgrupos	Média	DP	Total	Média	DP	Total	Peso	Diferença entre médias, IV, Random, 95% IC
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	1,0	0,01	6	1,0	0,01	6	6,78	0 (-0,01 to 0,01)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	1,1	0,02	6	1,2	0,02	6	6,77	-0,1 (0,07 to -0,12)
Memije-Lazaroa et al. (2018)a'	1,0	0,01	6	1,0	0,1	6	6,74	0 (-0,08 to 0,08)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b'	1,1	0,02	6	1,1	0,04	6	6,77	0 (-0,03 to 0,03)
Bin Jumah et al. (2020)c	3,93	0,21	8	2,46	0,06	8	6,63	1,47 (1,62 to 1,31)
Bin Jumah et al. (2020)d	3,93	0,21	8	0,59	0,05	8	6,63	3,34 (3,49 to -3,19)
Gargouri et al. (2018)	0,98	0,08	8	0,88	0,07	8	6,74	0,1 (0,17 to 0,02)
Gargouri et al. (2020)	0,96	0,04	8	0,81	0,05	8	6,76	0,15 (0,19 to 0,10)
Khalil et al. (2020)e	0,87	0,05	10	1,86	0,06	10	6,76	-0,99 (-0,94 to -1,03)
Khalil et al. (2020)f	0,87	0,05	10	2,45	0,15	10	6,72	-1,58 (-1,48 to -1,67)
Khalil et al. (2020)g	0,87	0,05	10	1,86	0,03	10	6,77	-0,99 (-0,95 to -1,02)
Zaham et al. (2018)	1,34	0,11	10	0,41	0,06	10	6,74	0,93 (1,00 to 0,85)
Martin et al. (2016)h	2,7	0,32	6	1,54	0,22	6	6,20	1,16 (1,47 to 0,84)
Martin et al. (2016)i	2,7	0,32	6	1,31	0,19	6	6,24	1,39 (1,68 to 1,09)
Viswanadha et al. (2011)	2,0	0,05	6	1,6	0,06	6	6,75	0,40 (0,46 to 0,33)
Total (IC 95%)			114			114	100 %	0,33 (0,60 a 0,07)



Heterogeneidade: Tau = 0,18; Intercept = 4,71; df = 14 (P < 0,0001); I^2 = 99,84%. Teste para efeito geral: z = 2,49 (P=0,012)

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *Arthrospira* (*sin. Spirulina*) OU C-FICOCIANINA NA CONCENTRAÇÃO DE UREIA (U)

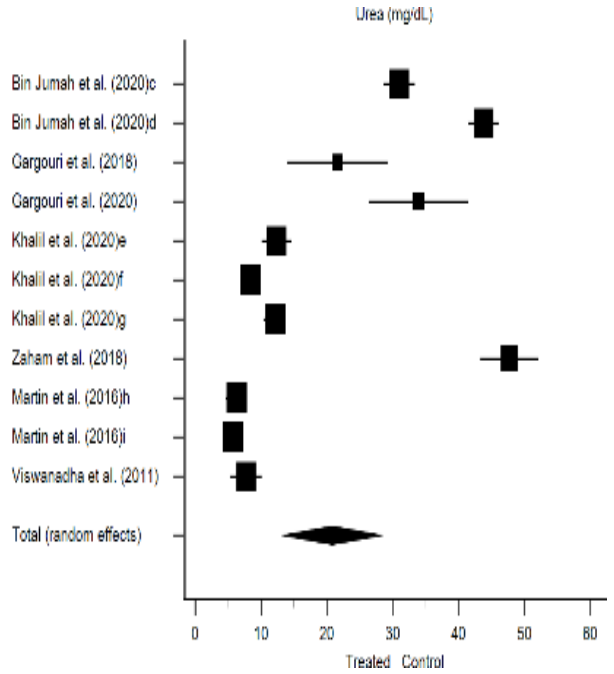
O consumo de *Spirulina platensis* para proteção do tecido renal na toxicidade da acrilamida nas doses de 500 e 1000mg/kg p.b./dia + Acrilamida (20 mg/kg/dia) por 5 semanas demonstrou uma resposta significativa na melhoria dos níveis de U, com o melhor resultado obtido pelo consumo de 1000mg/kg p.b./dia + Acrilamida (20 mg/kg/dia) (BIN JUMAH et al., 2020d, e). A baixa dose de *Spirulina platensis* de 1,5g/kg b.w/dia + 6g/L acetate de Pb através de água potável foi mais eficiente na melhoria dos níveis de U no grupo tratado com danos oxidativos induzidos por Pb em comparação com a dose de 5,3g/kg b.w/dia + 6g/L Pb acetato através de água potável em tratamento por 4 semanas (GARGOURI et al.,2018; GARGOURI et al.,2020).

Consumo de *Spirulina platensis* (300 mg/kg p.b./dia, dissolvido em água destilada) + Furan (16 mg/kg p.b./dia, dissolvido em óleo de milho Mazola) na forma preventiva e grupos de co-tratamento protetor/terapêutico sendo administrados dose de SP antes, durante e após a exposição ao furan demonstrou melhora significativa nos níveis de U (KHALIL et al., 2020e, f, g). Em relação ao estresse oxidativo e efeitos protetores renais mediados pelo estresse oxidativo da nicotina, respectivamente, o consumo de *Spirulina fusiformis* (400 mg/kg p.c./dia) + INH e RIF (50 mg/kg p.c./dia) por 4 semanas e extrato de *Spirulina platensis* (500 mg/Kg P.c/dia, dissolvido em soro fisiológico) + 0,5mg de nicotina (base/kg p.c/dia) por 4 semanas, respectivamente, níveis reduzidos de U nos grupos tratados (MARTIN *et al*.,2016 h; ZAHAM et al., 2018). Consumo de *Spirulina* (500 mg/kg p.c./dia) por 2 semanas para efeito protetor em 4-nitroquinolina-1-óxido induzido toxicidade renal moderadamente reduzida nos níveis de U no grupo tratado (VISWANADHA et al., 2011) (Tabela 1-C, material suplementar).

A metanálise dos estudos indicou que a administração de *Arthrospira (sin. Spirulina*) ou ficocianina teve um efeito significativo nos níveis de uréia (20,80; IC: 95% 13,10 a 28,50; P <0,001) com base nos 11 subgrupos analisados. O grau de heterogeneidade foi I^2 de 99,28% (P < 0,0001) (Tabela 2-B).

Tabela 2-B. Sumário dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou C-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal ureia (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise.

	Controle			Tratado				
Estudos ou subgrupos	Média	DP	Total	Média	DP	Total	Peso	Diferença entre médias, IV, Random, 95% IC
Bin Jumah et al. (2020)c	77,79	3,23	8	46,77	1,1	8	9,22	31,02 (28,65 to 33,38)
Bin Jumah et al. (2020)d	77,79	3,23	8	33,94	0,96	8	9,22	43,85 (41,51 to 46,18)
Gargouri et al. (2018)	78,07	7,8	8	56,45	7,8	8	8,52	21,62 (13,97 to 29,26)
Gargouri et al. (2020)	87,98	7,8	8	54,08	7,62	8	8,53	33,90 (26,34 to 41,45)
Khalil et al. (2020)e	48,33	2,2	10	35,97	2,82	10	9,23	12,36 (10,14 to 14,57)
Khalil et al. (2020)f	48,33	2,2	10	39,88	0,98	10	9,26	8,45 (6,95 to 9,94)
Khalil et al. (2020)g	48,33	2,2	10	36,25	1,6	10	9,26	12,08 (10,39 to 13,76)
Zaham et al. (2018)	93,34	4,52	10	45,66	5,43	10	9,03	47,71 (43,33 to 52,08)
Martin et al. (2016)h	19,85	1,34	6	13,54	1,45	6	9,26	6,31 (4,73 to 7,89)
Martin et al. (2016)h	19,85	1,34	6	14,15	1,22	6	9,27	5,7 (4,25 to 7,15)
Viswanadha et al. (2011)	29,7	2,4	6	22,00	1,8	6	9,21	7,7 (5,29 to 10,10)
Total (CI 95%)			90			90	100%	20,80 (13,10 to 28,50)



Heterogeneidade: Tau = 0,49; Intercept = 15,32; df = 10 (P < 0,0001); I^2 = 99,28%. Teste de efeito geral: z = 5,29 (P<0,001).

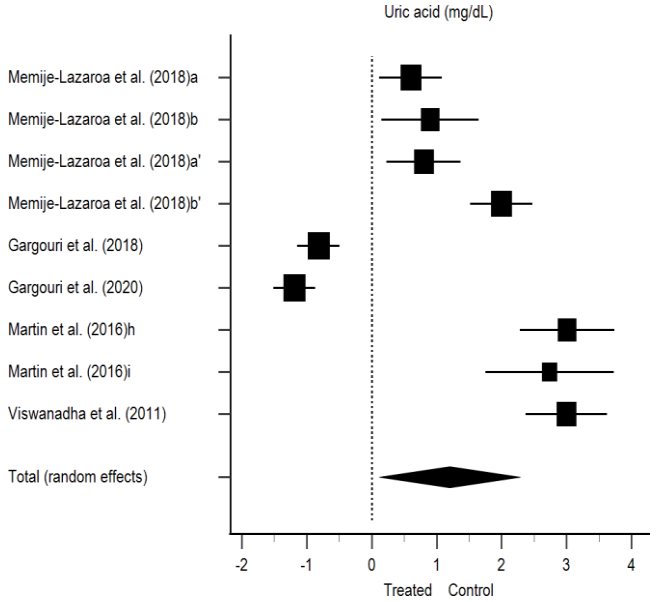
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *Arthrospira* (*sin. Spirulina*) OU C-FICOCIANINA NA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO (AU)

Para doenças renais crônicas, foi demonstrado que o consumo de *Arthrospira maxima* (1g/kg p.c./dia) e C-ficocianina (100 mg/kg p.b./dia) por 5 semanas diminuiu moderadamente os níveis de AU no grupo tratado (MEMIJE-LAZARO et al., 2018). O consumo de *Spirulina fusiformis* (400 mg/kg p.c./dia) + INH e RIF (50 mg/kg p.c./dia) por 4 semanas diminuiu os níveis de AU no grupo tratado com estresse oxidativo (MARTIN et al., 2016 h). Em contraste, o tratamento com *Spirulina platensis* em doses de 5,3g/kg p.v./dia + 6g/L Pb acetato através de água potável e 1,5g/kg p.c./dia + 6g/L Pb acetato através de água potável por 4 semanas em danos oxidativos induzidos por Pb aumentou significativamente os níveis de AU no grupo tratado (GARGOURI et al., 2020). O consumo de *Spirulina* (500 mg/kg b.w./dia) por 2 semanas em 4-nitroquinolina-1-óxido induzido toxicidade renal demonstrou melhorar significativamente os níveis de AU no grupo tratado (VISWANADHA et al., 2011) (Tabela 1-B, material suplementar).

A meta-análise dos estudos indicou que a administração de *Spirulina (Arthrospira)* ou ficocianina teve um efeito moderado no controle dos níveis de ácido úrico (1,20; IC: 95% 2,28 a 0,11; P=0,03) com base nos 9 subgrupos analisados. O grau de heterogeneidade foi notável: I^2 de 97,59%. ($P < 0.0001$) (Tabela 2-C).

Tabela 2-C. Sumário dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou C-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal ácido úrico (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise.

	Controle			Tratado				
Estudo ou subgrupos	Média	DP	Total	Média	DP	Total	Peso	Diferença entre médias, IV, Random, 95% IC
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	4,0	0,04	6	3,4	0,6	6	11,27	0,60 (1,08 to 0,12)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	5,8	0,6	6	4,9	0,7	6	10,93	0,9 (1,64 to 0,15)
Memije-Lazaroa et al. (2018)a'	4,0	0,4	6	3,2	0,6	6	11,17	0,8 (1,36 to 0,23)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b'	5,8	0,6	6	3,8	0,03	6	11,27	2,0 (2,48 to 1,52)
Gargouri et al. (2018)	2,71	0,22	8	3,53	0,41	8	11,41	-0,82 (0,49 to -1,14)
Gargouri et al. (2020)	2,71	0,21	8	3,9	0,41	8	11,41	-1,19 (0,87 to -1,50)
Martin et al. (2016)h	12,17	0,56	6	9,16	0,72	6	10,95	3,01 (3,73 to 2,28)
Martin et al. (2016)i	12,17	0,56	6	9,43	1,1	6	10,51	2,74 (3,72 to 1,75)
Viswanadha et al. (2011)	8,5	0,6	6	5,5	0,5	6	11,09	3,0 (3,62 to 2,37)
Total (CI 95%)			58			58	100%	1,20 (2,28 to 0,11)



Heterogeneidade: Tau = 0,47; Intercept = 14,94; df = 8 (P < 0,0001); I^2 = 97,59%. Teste para efeito geral: z = 2,17 (P=0,03).

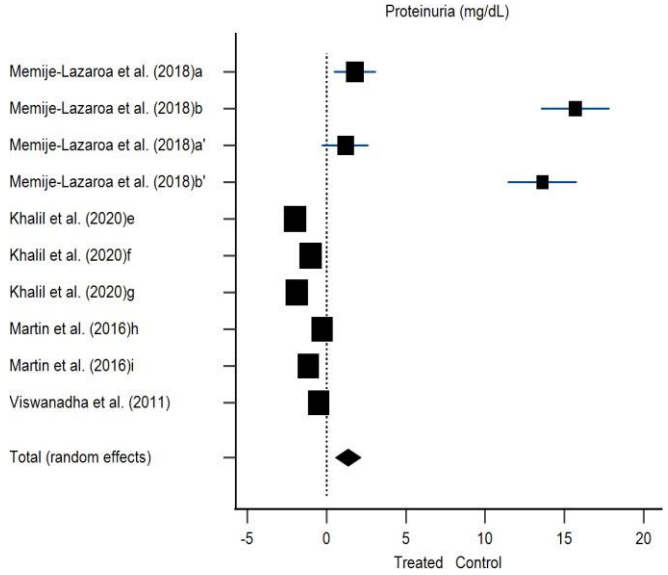
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *Arthrospira* (*sin. Spirulina*) **OU C-FICOCIANINA NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINÚRIA (PTU)**

Os níveis de concentração de proteinúria para doença renal crônica diminuíram substancialmente com o consumo de *Arthrospira maxima* (1g/kg p.b./dia) e C-ficocianina (100 mg/kg p.b./dia) por 5 semanas no grupo nefrectomizado (MEMIJE-LAZAROA et al., 2018a, b). O tratamento para proteção em tecidos renais expostos à intoxicação furânica com *Spirulina platensis* (300 mg/kg p.c./dia, dissolvido em água destilada) + Furan (16 mg/kg p.c./dia, dissolvido em óleo de milho Mazola) por 4 semanas não melhorou os níveis de PTU no grupo tratado (KHALIL et al., 2020e, f, g). O tratamento com *Spirulina fusiformis* (400 mg/kg de peso vivo/dia) + INH e RIF (50 mg/kg de peso vivo/dia) por 4 semanas não melhorou os níveis de PTU (MARTIN et al., 2016h, i). Também não houve melhora nos níveis de PTU em 4-nitroquinolina-1-óxido induzido toxicidade renal com tratamento com *Spirulina* (500 mg/kg de peso vivo/dia) por 2 semanas (VISWANADHA et al., 2011) (Tabela 1-D, material suplementar).

A metanálise dos estudos indicou que a administração de *Spirulina (Arthrospira*) ou ficocianina teve um efeito prejudicial sobre os níveis de proteinúria (1,36; IC: 95% 2,18 a 0,54; P=0.001) com base nos 10 subgrupos analisados. O grau de heterogeneidade foi I^2 de 98,73% (P < .0001) (Tabela 2-D).

Tabela 2-D. Sumário dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou C-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta ao biomarcador de função renal proteinúria (mg/dL). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise.

	Controle			Tratado				
Estudo ou subgrupos	Média	DP	Total	Média	DP	Total	Peso	Diferença entre médias, IV, Random, 95% IC
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	3,0	1,4	6	1,2	0,9	6	8,99	1,80 (0,46 to 3,13)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	16,9	2,7	6	1,2	0,1	6	6,49	15,70 (13,54 to 17,85)
Memije-Lazaroa et al. (2018)a'	3,0	1,4	6	1,8	1,2	6	8,55	1,20 (-0,27 to 2,67)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b'	16,9	2,7	6	3,3	0,2	6	6,43	13,60 (11,42 to 15,77)
Khalil et al. (2020)e	3,89	0,06	10	5,87	0,03	10	11,81	-1,98 (-1,93 to -2,02)
Khalil et al. (2020)f	3,89	0,06	10	4,9	0,31	10	11,74	-1,01 (-0,81 to -1,20)
Khalil et al. (2020)g	3,89	0,06	10	5,77	0,34	10	11,72	-1,88 (-1,66 to -2,09)
Martin et al. (2016)h	4,75	0,42	6	5,03	0,36	6	11,42	-0,28 (0,16 to -0,72)
Martin et al. (2016)i	4,75	0,42	6	5,92	0,48	6	11,30	-1,17 (-0,66 to -1,68)
Viswanadha et al. (2011)	5,9	0,4	6	6,4	0,2	6	11,55	-0,50 (-0,14 to -0,85)
Total (CI 95%)			72			72	100%	1,36 (2,18 to 0,54)



Heterogeneidade: Tau = 0,33; Intercept = 8,61; df = 9 (P < 0,0001); I^2 = 98,73%. Teste para efeito geral: z = 3,26 (P=0,001).

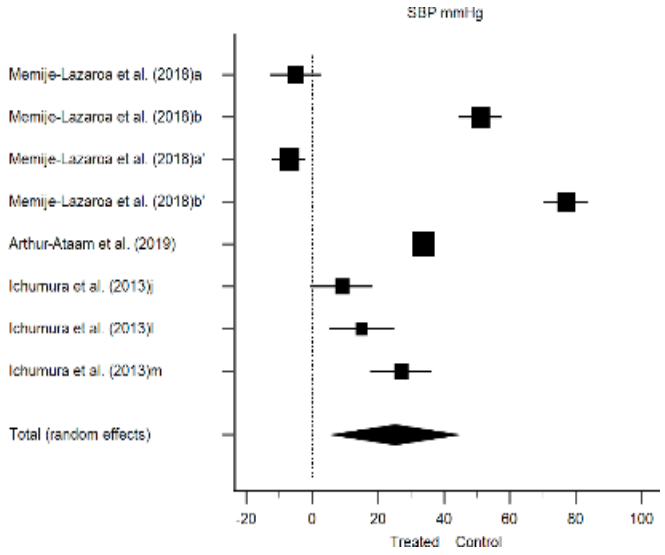
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *Arthrospira* (*sin. Spirulina*) **OU C-FICOCIANINA NOS NÍVEIS DE PRESSÃO SISTÓLICA (mmHg)**

Os níveis sistólicos diminuíram substancialmente no grupo nefrectomizado (-51 mmHg) com o tratamento usando *Arthrospira maxima* (1g/kg p.c./dia) e -77 mmHg com consumo de C-ficocianina (100 mg/kg p.b./dia) por 5 semanas (MEMIJE-LAZAROA et al., 2018). O consumo de *Spirulina platensi*s (15mg + 0,3 mg Si (2%) / 500 g p.b./dia) por 12 semanas diminuiu os níveis sistólicos em 33,9 mmHg em um grupo tratado em um modelo de alterações do sistema cardiovascular induzidas por hipertensão (ARTHUR-ATAAM et al., 2019). O consumo de proteção de ficocianina em hipertensão sistêmica e doenças vasculares com doses entre 2500 e 10000 mg/kg dieta/dia por 25 semanas demonstrou eficácia para o controle dos níveis sistólicos, com a dose de 10000mg/kg dieta/dia com melhores resultados para o controle da hipertensão (-27 mmHg) (ICHUMURA et al., 2013m) (Tabela 1-E, material suplementar.).

A meta-análise dos dados demonstram que houve controle nos níveis sistólicos nos grupos tratados com o consumo de *Arthrospira* (95% CI 44,82 a 5,50, P 0,012) e I^2 = 98,70%. A avaliação consistiu de 120 ratos distribuídos em grupos de controle e tratados (Tabela 2-E).

Tabela 2-E. Sumário dos resultados quantitativos sobre a eficácia da exposição da *Spirulina* ou C-ficocianina em grupo com patologia renal e o grupo controle em resposta aos níveis de pressão arterial sistólica (mmHg). A figura abaixo (*forest plot*) consiste na representação gráfica dos resultados da metanálise.

	Controle			Tratado				
Estudos ou subgrupos	Média	DP	Total	Média	DP	Total	Peso	Diferença entre médias, IV, Random, 95% IC
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	113	6,3	6	118	7,2	6	12,49	-5 (2,6 to -12,66)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	207	4,6	6	156	6,9	6	12,55	51 (57,64 to 44,35)
Memije-Lazaroa et al. (2018)a'	113	6,3	6	120	0,8	6	12,63	-7 (-1,92 to -12,07)
Memije-Lazaroa et al. (2018)b'	207	4,6	6	130	7	6	12,55	77 (83,70 to 70,29)
Arthur-Ataam et al. (2019)	157,1	3,2	15	123,2	5,5	15	12,69	33,90 (37,11 to 30,68)
Ichumura et al. (2013)j	179	10	7	170	8	7	12,38	9 (18,40 to -0,40)
Ichumura et al. (2013)l	179	10	7	164	9	7	12,33	15 (24,99 to 5,00)
Ichumura et al. (2013)m	179	10	7	152	8	7	12,38	27 (36,40 to 17,59)
Total (CI 95%)			60			60	100%	25,16 (44,82 to 5,50)



Heterogeneidade: Tau = -0,03; Intercept = -2,46; df = 7 (P < 0,0001); I^2 = 98,70%. Teste para efeito geral: z = 2,5 (P=0,012).

DISCUSSÃO

Até o presente momento, este estudo quantitativo é o primeiro a revisar e avaliar o potencial nefroprotetor da *Spirulina (Arthrospira)* e seus componentes celulares, como a C-ficocianina, no contexto de doença renal e hipertensão em modelos pré-clínicos. Para isso, verificamos a respostar nefroprotetora através dos biomarcadores clássicos de função renal, como: a creatinina sérica, uréia, ácido úrico, proteinuria, além dos níveis de pressão arterial sistólica.

Pacientes com doença renal apresentam diversos sintomas físicos, incluindo um estado nutricional gravemente comprometido, podendo ser decisivo em aumentar o risco de infecções, tempo de hospitalização, custos de saúde e mortalidade (BECTOR et al., 2016; RIDLEY et al., 2015; ORDOÑEZ et al., 2013; WAITZBERG et al., 2016). É recomendado para pacientes com lesão renal aguda consumir carboidratos entre 20 e 30 kcal/kg/dia de peso seco ou ideal (em caso de obesidade ou peso muito baixo) e proteínas entre 1,3 e 1,5 g/kg/dia. Na doença renal crônica, recomenda-se 25 a 35 kcal/kg/dia de carboidratos para pacientes metabolicamente estáveis, com base na idade, sexo, atividade física, estado nutricional, estágio de CKD e comorbidades associadas; para adultos, a quantidade de proteínas é de 0,6 a 0,8 g/kg/dia (BRASPEN J 2021). A *Spirulina (Arthrospira*) é considerada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma superalimento e uma alternativa nutricional de fácil assimilação pelo corpo humano com propriedades nutracêuticas já reconhecidas.

Os resultados desta revisão sistemática e meta-análise, obtidos a partir de dez estudos pré-clínicos randomizados publicados nos últimos dez anos, sugerem que o consumo terapêutico de *Spirulina (Arthrospira*) ou C-ficocianina não proporcionou uma melhora significativa nos níveis de creatinina sérica na maioria dos estudos pré-clínicos analisados, utilizando doses mínimas de 100mg/kg p.b./dia a 5,3g/kg p.b./dia e intervenção entre 4 a 5 semanas. A creatinina é um produto metabólico muscular de creatina e a fosfocreatina é livremente filtrada pelo glomérulo e, em condições normais, não é metabolizada ou reabsorvida pelo rim. Quando há alguns danos renais, os níveis elevados de creatinina no sangue podem indicar insuficiência renal (LIMA, 2022).

A uréia sérica é um biomarcador amplamente utilizado na prática clínica, e exerce uma correlação útil com a creatinina sérica quando se avalia diminuições abruptas na taxa de filtração glomerular. É parcialmente reabsorvida pelos túbulos renais após a filtração renal, enquanto que a creatinina não. Níveis aumentados para ambos podem indicar doença renal (ABENSUR, 2011). A partir dos dados avaliados, os níveis de uréia e ácido úrico diminuíram durante os tratamentos com *S. platensi*s ou C-ficocianina com doses para uréia entre 300mg/kg p.c./dia e 5,3g/ kg p.c./dia e ácido

úrico entre 100mg/kg p.b./dia e 5,3g/ kg p.b./dia durante 2 a 5 semanas de intervenção; o que pode ser um indicativo para melhora da função renal.

A quantificação da proteinúria indica o tipo de diagnóstico, a intervenção terapêutica e a progressão da doença renal. Quanto mais altos os níveis de PTU, mais a função renal é comprometida (ALVES, 2004). Os níveis de proteinúria analisados aumentaram significativamente com o tratamento usando *S. platensis* ou C-ficocianina na maioria dos estudos com doses variando de 100mg/kg p.b./dia a 1g/kg p.b./dia por 2 a 5 semanas, com melhora nos níveis de PTU somente em um estudo realizado para doença renal crônica em tratamento por 5 semanas com doses de 100mg e 1g/b.p./dia (MEMIJE-LAZAROA et al., 2018).

Quanto aos níveis sistólicos, houve uma redução significativa com tratamento usando *S. platensis* ou C-ficocianina por 5 a 25 semanas de intervenção, com doses de 15mg/500g p.c./dia para 1g/kg p.b.c./dia. Ensaios clínicos já indicam que o uso de *S. platensis* como um anti-hipertensivo eficaz, como relatado por Zohreh et al. em um ensaio clínico randomizado, no qual uma resposta satisfatória anti-hipertensiva e anti-hiperlipidêmica à *Spirulina platensis* foi obtida em 48 pacientes com hipertensão por dois meses. A revisão sistemática e a meta-análise em ensaios clínicos aleatórios realizados por Machowiec et al. sugeriram que a suplementação da *Spirulina* durante um período de 2 a 12 semanas é benéfica para o controle da pressão sistólica e diastólica (MACHOWIEC et al., 2021).

A meta-análise permitiu a investigação da resposta nutracêutica da *Spirulina* e da C-ficocianina sobre biomarcadores da função renal a partir do uso de suplementos e tempo de intervenção. Além disso, nenhum viés de publicação foi verificado através dos testes Egger's e Begg's. Algumas limitações também devem ser consideradas, os estudos considerados para análise apresentam diferenças nas abordagens metodológicas entre autores, como diferentes doses de *Spirulina* ou C-ficocianina, tempo variável de tratamento, adição de outras substâncias ativas e diferentes modelos de doença renal ou nefrotoxicidade, o que pode justificar a alta heterogeneidade observada. Finalmente, em alguns estudos foram analisados biomarcadores da função renal como um resultado secundário.

CONCLUSÃO

Em geral, esta revisão e meta-análise indica que a suplementação com *Spirulina* ou C-ficocianina em modelos pré-clínicos pode ter efeitos benéficos nos níveis séricos de ácido úrico e uréia, como na diminuição da pressão sistólica. Em relação aos níveis de creatinina sérica, por outro lado, não houve efeito significativo. A proteinúria foi bem controlada apenas em um modelo de doença renal crônica. As doses para os tratamentos podem estar entre 100 mg/p. c kg/ dia e 5,3g/p. c kg/ dia e com intervenção durante 25 semanas. Finalmente, devem ser realizadas mais investigações para atestar estes resultados em modelos clínicos.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores deste estudo declaram que não há conflito de interesses em relação aos resultados apresentados.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Concepção do projeto do estudo: Hilario, G. S. Extração de dados: Hilario, G. S, Pedrosa, R.B. Redação do manuscrito, análise e interpretação dos dados e aprovação do artigo: Todos os autores.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARTHUR-ATAAM, Joanna et al. Dietary supplementation with silicon-enriched spirulina improves arterial remodeling and function in hypertensive rats. Nutrients, v. 11, n. 11, p. 2574, 2019.

BARKIA, I., SAARI, N. & MANNING, S.R. 2019. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. Marine Drugs, 17(5): 304. doi: 10.3390/md17050304. PMID: 31137657; PMCID: PMC6562505.

BESCO´S PB, ESTRADA EP, FRESNO, AMV. Neuroprotection by Spirulina platensis protean extract and phycocyanin against iron-induced toxiticy in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Toxicol In Vitro 2008; 22:1496–1502.

BIN-JUMAH, May N. et al. Potential protective effects of Spirulina platensis on liver, kidney, and brain acrylamide toxicity in rats. Environmental Science and Pollution Research, v. 28, n. 21, p. 26653-26663, 2021.

BRASPEN J 2021; 36 (2o Supl 2): 2-22

DENG R, CHOW TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. Cardiovasc Ther. 2010;28(4):e 33–e45. 16.

ERIKSEN NT. Production of phycocyanin—A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Appl Microbiol Biotechnol 2008; 80:1–14

FAO, Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development. Fisheries and Aquaculture Circular No. 1229 (i.e. the current document).

FAO. 2021c. Fishery and Aquaculture Statistics. Global production by production source 1950–2019 (FishStatJ).

FAROOQ SM, ASOKAN D, KALAISELVI P, et al. Prophylactic role of phycocyanin: a study of oxalate mediated renal cell injury. Chem Biol Interact 2004; 149:1–7.

G. MARKOU AND E. NERANTZIS, “Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions,” Biotechnology Advances, vol. 31, no. 8, pp. 1532–1542, 2013.

GARGOURI, M. et al. Protective effects of spirulina against hemato-biochemical alterations, nephrotoxicity, and DNA damage upon lead exposition. Human & experimental toxicology, v. 39, n. 6, p. 855-869, 2020.

GARGOURI, Manel et al. Potential protective effects of the edible alga *Arthrospira platensis* against lead-induced oxidative stress, anemia, kidney injury, and histopathological changes in adult rats. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, v. 44, n. 3, p. 271-281, 2019.

GLAZER, AN. Phycobiliproteins—A family of valuable, widely used fluorophore. J Appl Psychol 1994;6:105–112

GUTIÉRREZ-SALMEÁN G, FABILA-CASTILLO L, CHAMORRO-CEVALLOS G. Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina (Arthrospira*). Nutr Hosp. 2015;32 (1):34–40.

HIGGINS JPT, THOMAS J, CHANDLER J, CUMPSTON M, LI T, PAGE MJ, WELCH VA (editores). Manual cochrane para revisões sistemáticas de intervenções versão 6.2 (atualizado fevereiro de 2021). Cochrane, 2021. Disponível em www.training.cochrane.org/handbook.

ICHIMURA, MAYUKO et al. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. Nutrition Research, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

KARKOS PD, LEONG SC, KARKOS CD, SIVAJI N, ASSIMAKOPOULOS DA. *Spirulina* in clinical practice: evidence-based human applications. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:1–4.

KHALIL, SAMAH R. et al. Protective effect of *Spirulina platensis* against physiological, ultrastructural and cell proliferation damage induced by furan in kidney and liver of rat. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 192, p. 110256, 2020.

KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) BLOOD PRESSURE WORK GROUP. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. Kidney Int. 2021;99(3S):S1–S87.

MACHOWIEC, P.; R KA, G.;MAKSYMOWICZ, M.; PIECEWICZ-SZCZ SNA, H.; SMOLE´N, A. Effect of *Spirulina* Supplementation on Systolic and Diastolic Blood Pressure: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized ControlledTrials.Nutrients2021,13, 3054.

MARTIN, SHERRY JOSEPH; SABINA, Evan Prince. Amelioration of anti-tuberculosis drug induced oxidative stress in kidneys by *Spirulina fusiformis* in a rat model. Renal failure, v. 38, n. 7, p. 1115-1121, 2016.

MARTÍNEZ-GALERO E, PÉREZ-PASTÉN R, PEREZ-JUAREZ A, FABILA-CASTILLO L, GUTIÉRREZ-SALMEÁN G, CHAMORRO G. Preclinical antitoxic properties of *Spirulina (Arthrospira).* Pharm Biol. 2016;54(8):1345–1353. 17.

MEMIJE-LAZARO, Ivonne Nayelli et al. Arthrospira maxima (Spirulina) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. Journal of Functional Foods, v. 43, p. 37-43, 2018.

O' SEAGHDHA CM, PERKOVIC V, LAM TH, et al; Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Blood pressure is a major risk factor for renal death: an analysis of 560 352 participants from the Asia-Pacific region. Hypertension. 2009;54:509-15. [PMID:19597042] doi:10 .1161/HYPERTENSIONAHA.108.128413

ORDOÑEZ AM, MALADOZZO SCHIEFERDECKER ME, CESTONARO T, CARDOSO NETO J, LIGOCKI CAMPOS AC. Nutritional status influences the length of stay and clinical outcomes in patients hospitalized in internal medicine wards. Nutr Hosp. 2013;28(4):1313-20

RIDLEY E, GANTNER D, PELLEGRINO V. Nutrition therapy in critically ill patients: a review of current evidence for clinicians. Clin Nutr. 2015;34(4):565-71.

ROMAY C, GONZA´LEZ R, LEDON, et al. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Curr Protein Pept Sci 2003; 4:207– 216.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. & ISAMBERT, A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 87–96.

STERNE JAC, SAVOVIĆ J, PAGE MJ, ELBERS RG, BLENCOWE NS, BOUTRON I, CATES CJ, CHENG H-Y, CORBETT MS, ELDRIDGE SM, HERNÁN MA, HOPEWELL S, HRÓBJARTSSON A, JUNQUEIRA DR, JÜNI P, KIRKHAM JJ, LASSERSON T, LI T, MCALEENAN A, REEVES BC, SHEPPERD S, SHRIER I, STEWART LA, TILLING K, WHITE IR, WHITING PF, HIGGINS JPT. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. BMJ 2019; 366: l4898.

TOZAWA M, ISEKI K, ISEKI C, et al. Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. Hypertension. 2003; 41:1341-5. [PMID:12707291]

VISWANADHA, Vijaya Padma; SIVAN, Siddharth; RAJENDRA SHENOI, Roopesh. Protective effect of Spirulina against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. Molecular biology reports, v. 38, n. 1, p. 309-317, 2011.

WAITZBERG DL, CORREIA MI. Strategies for high-quality nutrition therapy in Brazil. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2016;40(1):73-82.

ZAHRAN, Walid E.; EMAM, Manal A. Renoprotective effect of Spirulina platensis extract against nicotine-induced oxidative stress-mediated inflammation in rats. Phytomedicine, v. 49, p. 106-110, 2018.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

Tabela 1-A. Resumo dos estudos selecionados para a variável creatinina sérica (CS) (mg/dL).

Autor (ano)	Patologia renal	Protocolo de intervenção	Esquema de Tratamento	Creatinina sérica (mg/dL)			
				Controle		Tratamento	
				n	$\bar{X}$ DP	n	$\bar{X}$ DP
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	1.0 ± 0.01	6	1.0 ± 0.01
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	1.1 ± 0.02	6	1.2 ± 0.02
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C-ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	1.0 ± 0.01	6	1.0 ± 0.1
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C-ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	1.1 ± 0.02	6	1.0 ± 0.04
Bin Jumah et al. (2020)c	Nefroproteção em toxicidade por acrilamida	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Spirulina platensis*: 500mg/kg p.c/dia + Acrilamida: 20 mg/kg/dia por 5 semanas	8	3.93 ± 0.21	8	2.46 ±0.06
Bin Jumah et al. (2020)d	Nefroproteção em toxicidade por acrilamida	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Spirulina platensis*: 1000mg/kg p.c/dia + Acrilamida: 20 mg/kg/dia por 5 semanas	8	3.93 ± 0.21	8	0.59±0.05
Gargouri et al. (2018)	Nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb	Acesso livre a dieta enriquecida 5% com *Spirulina platensis* 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 5,3g/kg p.c/dia + 6g/L acetato de Pb através de água potável por 4 semanas	8	0.98±0.08	8	0.88±0.07
Gargouri et al. (2020)	Nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb	Acesso livre a dieta enriquecida 5% com *Spirulina platensis* 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 1,5g/kg p.c/dia + 6g/L acetato de Pb através de água potável por 4 semanas	8	0.96±0.04	8	0.81±0.05
Khalil et al. (2020)e	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	0.87 ± 0.05	10	1.86 ± 0.06

Khalil et al. (2020)f	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	0.87 ± 0.05	10	2.43 ± 0.15
Khalil et al. (2020)g	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	0.87 ± 0.05	10	1.86 ± 0.03
Zaham et al. (2018)	Renoproteção em estresse oxidativo-mediado induzido por nicotina	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Extrato de Spirulina platensis:* 500 mg/Kg P.C/dia (dissolvido em soro fisiológico) + 0,5mg base de nicotina/kg p.c / dia por 4 semanas	10	1.34 ± 0.11	10	0,41±0.06
Martin et al. (2016)h	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 400 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	2.7 ± 0.32	6	1.54 ± 0.22
Martin et al. (2016)i	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 800 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	2.7 ± 0.32	6	1.31 ± 0.19
Viswanadha et al. (2011)	Efeito protetor da *Spirulina* em toxicidade renal induzida por 4-nitroquinolina-1-óxido	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 2 semanas	*Spirulina:*500 mg/kg p.c./dia por 2 semanas	6	2,0 ± 0.05	6	1,6 ± 0.06

X: média; DP: desvio padrão; (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) são subdivisões dos estudos de Memije-Lazaro et al. (2018), Bin Jumah et al. (2020), Khalil et al. (2020) e Martin et al. (2016).

Tabela 1-B. Resumo dos estudos selecionados para a variável ácido úrico (AU) (mg/dL)

Autor (ano)	Patologia renal	Protocolo de intervenção	Esquema de tratamento	Ácido úrico (mg/dL)			
				Controle		Tratamento	
				n	$\bar{X}$ DP	n	$\bar{X}$ DP
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	4.0 ± 0.4	6	3.4 ± 0.6
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	5.8 ± 0.6	6	4.9 ± 0.7
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C--ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	4.0 ± 0.4	6	3.2 ± 0.6
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C--ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	5.8 ± 0.6	6	3.8 ± 0.03
Gargouri et al. (2018)	Nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb	Acesso livre a dieta enriquecida 5% com *Spirulina platensis* 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 5,3g/kg p.c/dia + 6g/L acetato de Pb através de água potável por 4 semanas	8	2.71±0.22	8	3.53±0.41
Gargouri et al. (2020)	Nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb	Acesso livre a dieta enriquecida 5% com *Spirulina platensis* 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 1,5g/kg p.c/dia + 6g/L acetato de Pb através de água potável por 4 semanas	8	2.71±0.21	8	3.90±0.41
Martin et al. (2016)h	Renoproteção no estresse oxidativo	Free diet access 24h/day. Total: 4 weeks	*Spirulina fusiformis*: 400 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	12.17 ± 0.56	6	9.16 ± 0.72
Martin et al. (2016)i	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 800 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	12.17 ± 0.56	6	9.43 ± 1.10
Viswanadha et al. (2011)	Efeito protetor da *Spirulina* em toxicidade renal induzida por 4-nitroquinolina-1-óxido	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 2 semanas	*Spirulina:*500 mg/kg p.c./dia por 2 semanas	6	8,5 ± 0.6	6	5,5 ± 0.5

X: média; DP: desvio padrão; (a), (b), (h) e (i) são subdivisões dos estudos de Memije-Lazaro et al. (2018) e Martin et al. (2016).

Tabela 1-C. Resumo dos estudos selecionados para a variável ureia (U) (mg/dL).

Autor (ano)	Patologia renal	Protocolo de intervenção	Esquema de tratamento	Ureia (mg/dL)			
				Controle		Tratamento	
				n	$\bar{X}$ DP	n	$\bar{X}$ DP
Bin Jumah et al. (2020)c	Nefroproteção em toxicidade por acrilamida	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Spirulina platensis*: 500mg/kg p.c/dia + Acrilamida: 20 mg/kg/dia por 5 semanas	8	77.79 ± 3.23	8	46.77 ±1.10
Bin Jumah et al. (2020)d	Nefroproteção em toxicidade por acrilamida	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Spirulina platensis*: 1000mg/kg p.c/dia + Acrilamida: 20 mg/kg/dia por 5 semanas	8	77.79 ± 3.23	8	33.94 ±0.96
Gargouri et al. (2018)	Nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb	Acesso livre a dieta enriquecida 5% com *Spirulina platensis* 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 5,3g/kg p.c/dia + 6g/L acetato de Pb através de água potável por 4 semanas	8	78.07 ± 7.8	8	56.45 ± 7.8
Gargouri et al. (2020)	Nefroproteção em danos oxidativos induzidos por Pb	Acesso livre a dieta enriquecida 5% com *Spirulina platensis* 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 1,5g/kg p.c/dia + 6g/L acetato de Pb através de água potável por 4 semanas	8	87.98±7.80	8	54.03±7.62
Khalil et al. (2020)e	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	48.33 ± 2.20	10	35.97 ± 2.82
Khalil et al. (2020)f	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	48.33 ± 2.20	10	39.88 ± 0.98
Khalil et al. (2020)g	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	48.33 ± 2.20	10	36.25 ± 1.60
Zaham et al. (2018)	Renoproteção em estresse oxidativo-mediado induzido por nicotina	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Extrato de Spirulina platensis:* 500 mg/Kg P.C/dia (dissolvido em soro fisiológico) + 0,5mg base de nicotina/kg p.c / dia por 4 semanas	10	93.37 ± 4.52	10	45.66±5.43
Martin et al. (2016)h	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 400 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	19.85 ± 1.34	6	13.54 ± 1.45

Martin et al. (2016)i	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 800 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	19.85 ± 1.34	6	14.15 ± 1.22
Viswanadha et al. (2011)	Efeito protetor da *Spirulina* em toxicidade renal induzida por 4-nitroquinolina-1-óxido	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 2 semanas	*Spirulina:*500 mg/kg p.c./dia por 2 semanas	6	29,7 ± 2,4	6	22,00 ± 1,8

X: média; DP: desvio padrão; (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) são subdivisões dos estudos de Bin Jumah et al. (2020), Khalil et al. (2020) e Martin et al. (2016).

Tabela 1-D. Resumo dos estudos selecionados para a variável proteinúria (PTU) (mg/dL).

Autor (ano)	Patologia renal	Protocolo de intervenção	Esquema de tratamento	Proteinúria (mg/dL)			
				Controle		Tretamento	
				n	$\bar{X}$ SD	n	$\bar{X}$ SD
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	3.0 ± 1.4	6	1.2 ± 0.9
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	16.9 ± 2.7	6	1.2 ± 0.10
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C--ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	3.0 ± 1.4	6	1.8 ± 1.2
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C--ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	16.9 ± 2.7	6	3.3 ± 0.2
Khalil et al. (2020)e	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	3.89 ± 0.06	10	5.87 ± 0,03
Khalil et al. (2020)f	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	3.89 ± 0.06	10	4.9 ± 0.31
Khalil et al. (2020)g	Proteção nos tecidos renais expostos à intoxicação furânica	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina platensis:* 300 mg/kg p.c/dia (dissolvido em água destilada) + Furano: 16 mg/kg p.c./dia (dissolvido em Óleo de milho Mazola) por 4 semanas	10	3.89 ± 0.06	10	5.77 ± 0.34
Martin et al. (2016)h	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 400 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	4.75 ± 0.42	6	5.03 ± 0.36
Martin et al. (2016)i	Renoproteção no estresse oxidativo	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 4 semanas	*Spirulina fusiformis*: 800 mg/kg p.c./dia + INH e RIF: 50 mg/kg p.c./dia por 4 semanas	6	4.75 ± 0.42	6	5.92 ± 0,48
Viswanadha et al. (2011)	Efeito protetor da *Spirulina* em toxicidade renal induzida por 4-nitroquinolina-1-óxido	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 2 semanas	*Spirulina:*500 mg/kg p.c./dia por 2 semanas	6	5,9 ± 0.4	6	6,4 ± 0.2

X: média; DP: desvio padrão; (a), (b), (e), (f), (g), (h) e (i) são subdivisões dos estudos de Memije-Lazaroa et al. (2018), Khalil et al. (2020) e Martin et al. (2016).

Tabela 1-E. Resumo dos estudos selecionados para a variável pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg).

Autor (ano)	Patologia renal	Protocolo de intervenção	Esquema de tratamento	PAS (mmHg)			
				Controle		Tratamento	
				n	$\bar{X}$ DP	n	$\bar{X}$ DP
Memije-Lazaroa et al. (2018)a	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	113 ± 6.3	6	118 ± 7.2
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	*Arthrospira maxima*: 1g/kg p.c/dia por 5 semanas	6	207 ± 4.6	6	156 ± 6.9
Memije-Lazaroa et al. (2018)a'	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C- ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	113 ± 6.3	6	120 ± 0.8
Memije-Lazaroa et al. (2018)b	Doença crônica renal	Acesso livre a dieta 24h/dia. Total: 5 semanas	C- ficocianina 100 mg/kg p.c/dia por 5 semanas	6	207 ± 4.6	6	130 ± 7.0
Arthur-Ataam et al. (2019)	Proteção em alterações do sistema cardiovascular induzidas por hipertensão	Acesso livre à dieta com Sp ou Sp-Si 2%* 24h/dia. Total: 5 semanas	*Spirulina platensis*: 15mg + 0.3 mg Si (2%) / 500 g p.c/dia por 12 semanas	15	157.1 ± 3.2	15	123.2 ±5.5
Ichumura et al. (2013)j	Proteção de ficocianina em hipertensão sistêmica e doenças vasculares	Acesso livre à dieta 24h/dia. Total: 25 semanas	*Ficocianina (0,25%): 2500 mg/kg de dieta/dia + MF** (dieta normal) por 25 semanas*	7	179 ± 10	7	170 ± 8
Ichumura et al. (2013)l	Proteção de ficocianina em hipertensão sistêmica e doenças vasculares	Acesso livre à dieta 24h/dia. Total: 25 semanas	*Ficocianina (0,5%): 5000 mg/kg de dieta/dia + MF** (dieta normal) por 25 semanas*	7	179 ± 10	7	164 ± 9
Ichumura et al. (2013)m	Proteção de ficocianina em hipertensão sistêmica e doenças vasculares	Acesso livre à dieta 24h/dia. Total: 25 semanas	*Ficocianina (1%): 1000 mg/kg de dieta/dia + MF** (dieta normal) por 25 semanas*	7	179 ± 10	7	152 ± 8

X: média; DP: desvio padrão; (a), (b), (j), (l) e (m) são subdivisões dos estudos de Memije-Lazaroa et al. (2018) e Ichumura et al. (2013). **Spirulina platensis e Spirulina platensis* sílico-enriquecida (SpSi); ** MF é uma dieta normal fornecida pela Oriental Yeast Co, Ltda.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta investigação, verificamos que a cianobactéria *Arthrospira platensis* está potencialmente relacionada com propriedades anti-hipertensivas e nefroprotetoras contidas em seus componentes celulares, especialmente peptídeos bioativos. O processo de digestão gastrointestinal *in vitro* da biomassa celular da *A. platensis* utilizando as enzimas pepsinas e pancreatina, sequencialmente, foi eficiente em extrair diversos peptídeos de baixo peso molecular relacionados ao mecanismo de inibição da enzima conversora de angiotensina-I. Este método, apesar de ter sido eficiente em demonstrar que enzimas digestivas podem liberar bioativos anti-hipertensivos da *Spirulina*, ainda se faz necessário avaliar se esses peptídeos, inicialmente identificados, são capazes de ultrapassar a barreira endotelial gástrica, serem absorvidos e então, atuarem sem a perda do potencial de inibição da ECA.

Quanto ao processo de purificação, atividade iECA quantificada após métodos cromatográficos combinados foi preservada, e quando comparada aos dados existentes que utilizam métodos similares de obtenção e separação, demonstrou uma alta resposta de inibição. O método cromatográfico por fase reversa tem sido o mais eficiente em separar peptídeos de baixo peso molecular, sobretudo, de ação iECA. Entretanto, para os peptídeos identificados neste estudo, informações sobre sequência e estrutura de aminoácidos, tamanho molecular e padrão de inibição são projetadas para futuras investigações e, assim, ajudar a estabelecer estratégias para mecanismos de ação anti-hipertensiva mais eficazes.

As evidências apontadas nas revisões sistemáticas, inicialmente, atestam que diversas espécies de micro e macroalgas são fontes promissoras de agentes nutracêuticos, incluindo o controle da hipertensão arterial. Para além disso, também foi apresentado neste estudo, pela primeira vez, o consumo de *Spirulina* auxiliando na promoção da proteção nos tecidos renais em diversos contextos pré-clínicos patológicos. Estes resultados fornecem uma excelente especulação para avaliações dos mecanismos bioquímicos envolvidos nos efeitos terapêuticos associados ao consumo da biomassa da *Spirulina* ou ficocianina, possibilitando futuras vias de investigação a partir da fisiopatologia renal.

Estes resultados, portanto, sugerem que a exploração biotecnológica da cianobactéria *Arthrospira (Spirulina)* pode fornecer matéria-prima para futuras formulações que visem fármacos anti-hipertensivos, como alternativas de tratamento naturais ou na composição de alimentos funcionais, que auxiliem na prevenção/tratamento de pacientes com hipertensão arterial crônica.

ANEXOS

TRABALHOS PUBLICADOS

An Acad Bras Cienc (2022) 94(2): e20201636 DOI 10.1590/0001-3765202220201636
Anais da Academia Brasileira de Ciências | *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*
Printed ISSN 0001-3765 I Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

MICROBIOLOGY

Algae as a source of peptides inhibitors of the angiotensin-converting enzyme: a systematic review

ANDREZA P. DE AMORIM, GABRIELLY H. DA SILVA, ROMERO M. P. BRANDÃO, ANA LÚCIA F. PORTO & RAQUEL P. BEZERRA

Abstract: Hypertension is a factor that contributes to the risk of chronic diseases. The inhibition of angiotensin-I converting enzyme (ACE) is a useful therapeutic approach to the hypertension treatment. The algae have been an alternative for the production of ACE inhibitory (ACEi) peptides from enzymatic hydrolysis due to their protein-rich biomass. The aim of this study was to systematically review the literature regarding the production, composition and activity of ACEi peptides derived from algae proteins. Systematic database searches identified 648 related articles. Among these, only 14 were selected according to the eligibility criteria to this review. Macroalgae are more studied than microalgae as sources of ACEi peptides. Furthermore, hydrolysates by thermolysin

CIÊNCIAS DA SAÚDE
APRENDIZADOS, ENSINO E PESQUISA NO CENÁRIO CONTEMPORÂNEO
VOLUME II

CAPÍTULO II

CIANOBACTÉRIA *ARTHROSPIRA PLATENSIS* COMO FONTE DE PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVO

DOI: 10.51859/amplla.csa528.2121-2

Andreza Pereira de Amorim [1]
Yanara Alessandra Santana Moura [2]
Gabrielly Hilário da Silva [3]
Karoline Mirella Soares de Souza [4]
Ana Lúcia Figueiredo Porto [5]
Raquel Pedrosa Bezerra [6]

[1] Graduanda do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE
[2] Graduanda do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE
[3] Mestranda em Biociência Animal. Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE
[4] Doutoranda em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UFPE
[5] Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
[6] Professora Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

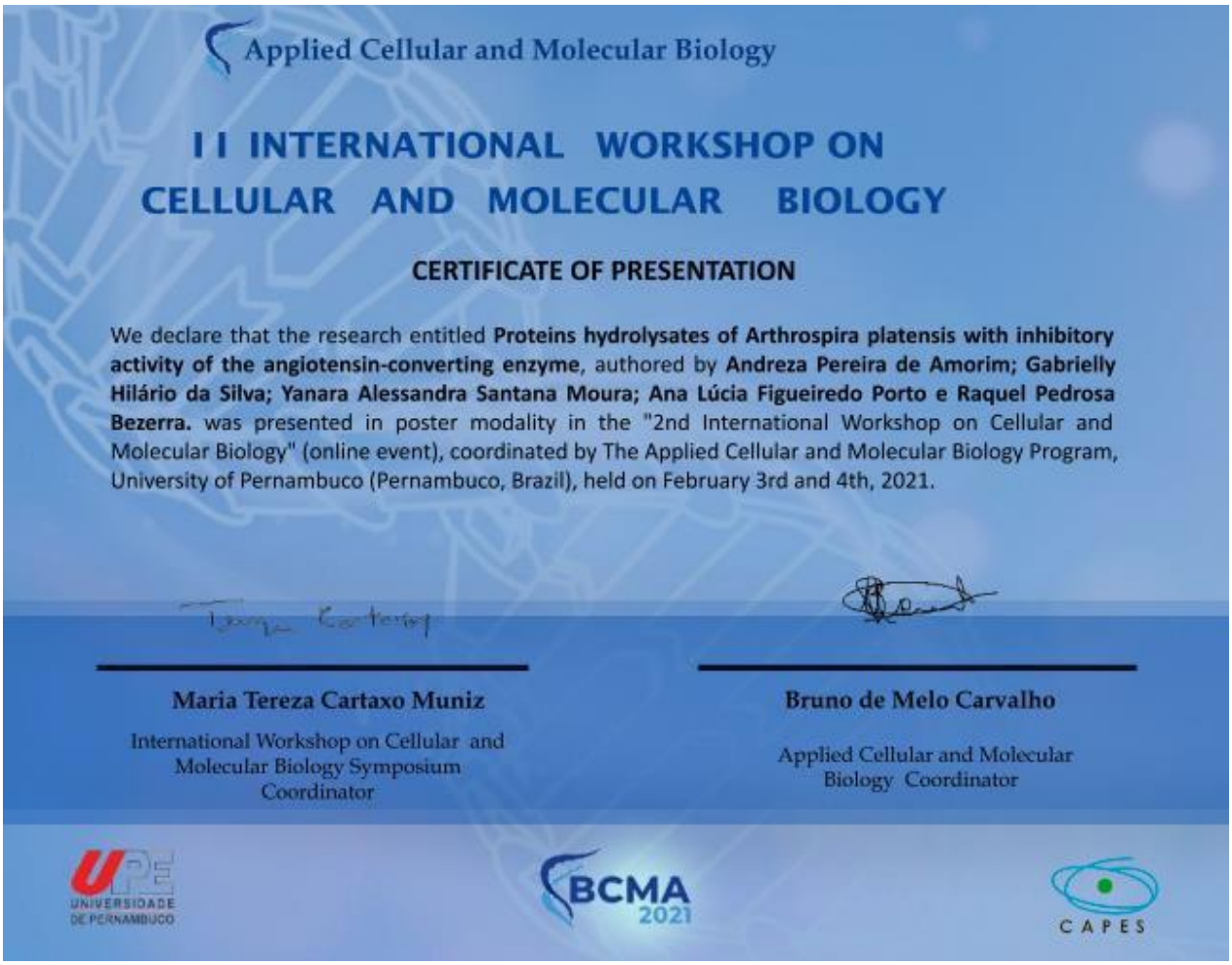
RESUMO

Peptídeos bioativos têm gerado numerosos benefícios à saúde humana. Em particular, os peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) têm mostrado atividade promissora para o controle da hipertensão, visto que essa enzima é uma das principais envolvidas no controle da pressão arterial. Fontes de origem animal, vegetal, e mais recentemente, os micro-organismos fotossintetizantes têm sido explorados para obtenção desses peptídeos. Um dos micro-organismos fotossintetizantes em destaque para obtenção de peptídeos inibidores da ECA (iECA) é a cianobactéria *Arthrospira platensis*, uma vez que em sua composição nutricional há alta quantidade de proteínas, podendo atingir até 70% do seu peso seco. Diante disso, este capítulo apresenta uma visão geral do potencial da *A. platensis* como uma fonte de peptídeos iECA.

Palavras-chave: Bioativos. Enzima conversora de angiotensina. Hipertensão. Inibidores.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas, nos quais desempenham benefícios à saúde humana (RIZZELLO *et al.*, 2017) e podem ser liberados por fermentação, hidrólise química ou enzimática (MANZANARES *et al.*, 2015; MURRAY; FITZGERALD, R., 2007; NONGONIERMA; FITZGERALD, R. J., 2018). Diversas atividades já



Applied Cellular and Molecular Biology

II INTERNATIONAL WORKSHOP ON CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

CERTIFICATE OF PRESENTATION

We declare that the research entitled **Proteins hydrolysates of Arthrospira platensis with inhibitory activity of the angiotensin-converting enzyme**, authored by **Andreza Pereira de Amorim; Gabrielly Hilário da Silva; Yanara Alessandra Santana Moura; Ana Lúcia Figueiredo Porto e Raquel Pedrosa Bezerra.** was presented in poster modality in the "2nd International Workshop on Cellular and Molecular Biology" (online event), coordinated by The Applied Cellular and Molecular Biology Program, University of Pernambuco (Pernambuco, Brazil), held on February 3rd and 4th, 2021.

Maria Tereza Cartaxo Muniz
International Workshop on Cellular and Molecular Biology Symposium Coordinator

Bruno de Melo Carvalho
Applied Cellular and Molecular Biology Coordinator

UPE UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO — BCMA 2021 — CAPES

Acesse https://doity.com.br/validar-certificado para verificar se este certificado é válido. Código de validação: 9RZPPB-AP

SIMPÓS 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

XX JEPEX
Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão

CERTIFICADO

Certificamos que **GABRIELLY HILÁRIO DA SILVA** apresentou o trabalho **"ANÁLISE DO MELHOR MÉTODO DE FRACIONAMENTO PROTÉICO A PARTIR DA BIOMASSA DE ARTHROSPIRA PLATENSIS"** de autoria de GABRIELLY HILÁRIO DA SILVA, RAQUEL PEDROSA BEZERRA, em sessão de **pôster digital** durante o **SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO - SIMPOS 2021**, realizado no período de 22/04/2021 a 23/04/2021.

Recife (PE), 23 de abril de 2021.

EX SEMINE SEGES