



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0707045-4 A2**

(22) Data de Depósito: 01/03/2007
(43) Data da Publicação: 12/04/2011
(RPI 2101)



(51) Int.Cl.:
A23L 1/305
A61K 38/08
A61K 38/04
A61P 3/06

(54) Título: **PRODUTO ALIMENTÍCIO E USO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO**

(30) Prioridade Unionista: 24/03/2006 EP 060756962

(73) Titular(es): Unilever N.V.

(72) Inventor(es): Mario Adriaan Vermeer, Yuguang Lin

(74) Procurador(es): Priscila Penha de Barros Thereza

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007151942 de 01/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/110297 de 04/10/2007

(57) Resumo: PRODUTO ALIMENTÍCIO E USO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO. A presente invenção se refere a um produto alimentício que compreende um peptídeo, dito peptídeo sendo caracterizado por possuir um número de aminoácidos de 6 a 20 e, em que o peptídeo é substancialmente insolúvel em água a 200 °C e um pH de 6,5, conforme evidenciado por uma aparência turba mensurável caso 10 mg do peptídeo for misturado com 10 ml de água desmineralizada a 200 °C e pH 6,5 e em que a carga líquida positiva do peptídeo é 0, conforme determinado pela somatória das cargas dos aminoácidos individuais de dito peptídeo em pH 6,5, e em que se o peptídeo for o hexa-peptídeo, 6 aminoácidos de dito peptídeo são selecionados a partir do grupo que consiste em A, V, L, I, P, W, F e M.



PI0707045-4

1

“PRODUTO ALIMENTÍCIO E USO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um produto alimentício que compreende um ingrediente que possui um efeito de diminuição do colesterol sanguíneo, de preferência, em quantidades suficientes para obter um efeito de diminuição do colesterol sangüíneo caso o produto alimentício for utilizado de acordo com as necessidades usuais do consumidor.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A variação da concentração média de colesterol total no plasma entre as populações está altamente correlacionada com a variação na quantidade de arteriosclerose e com a incidência de Doença Cardíaca Coronária (CHD), que é uma das principais causas de morte na sociedade Ocidental. As populações com um baixo nível de colesterol (inferior a 180 mg/dl (4,7 mmol/ L)) foram descobertas como sendo menos sensíveis à arteriosclerose e às doenças cardíacas coronárias, enquanto que aquelas com níveis médio de colesterol acima de 220 mg/ dl (5,7 mmol/ L; hipercolesterolemia) possuem maiores incidências de morte devido ao CHD. Portanto, há uma necessidade óbvia por um método pelo qual o nível de colesterol possa ser diminuído.

Os ésteres de esteróis e esterol foram propostos como ingredientes de diminuição do colesterol sangüíneo, por exemplo, no pedido de patente EP 619.952 (Amano), um aditivo alimentício é descrito, em que o nível de colesterol no alimento é diminuído ao tratar o alimento com o aditivo alimentício. Na utilização do aditivo (γ - orizanol sendo mencionado), é formado um complexo com o colesterol no alimento. O alimento contendo o aditivo não pode, portanto, ser aplicado para diminuir o nível de colesterol sangüíneo em mamíferos.

No documento WO 92/19640 (Raison Margariini Oy) uma

substância de éster de ácido graxo de β -sitostanol é descrita e pode ser utilizada como tal ou adicionada ao alimento. É descrito que uma dieta comum contém esteróis vegetais de 100 a 300 mg/dia, e que estes esteróis são fracamente absorvidos pelos intestinos. No documento WO 92/19640, é
5 portanto, discutido que a utilização dos esteróis vegetais não pode ser utilizada para a redução dos níveis de colesterol do soro sanguíneo na dieta humana. O efeito de diminuição do colesterol do esterol ou estanol vegetal ou seus ésteres foi descrito como sendo principalmente por meio da inibição da incorporação do colesterol em micelas.

10 O documento EP 828.434 descreve que uma diminuição do nível de colesterol sanguíneo é capaz de ser obtido pelo consumo regular de produtos alimentícios com base em gordura que compreendem pelo menos um composto do grupo que consiste em fitosteróis e orizanol, e suas misturas.

Outros ingredientes também foram sugeridos para a diminuição
15 do colesterol sanguíneo. Por exemplo, o documento WO 01/24789 descreve β -peptídeos como substâncias ativas para a redução da ingestão de colesterol e ingestão de lipídeo pelo intestino. De modo a agir como um precipitante, estes peptídeos precisam de pelo menos duas cargas positivas. Entretanto, a utilização de β -peptídeos, algumas vezes não é desejável porque eles
20 possuem uma estrutura química diferente para peptídeos de ocorrência natural.

O documento US 2001/0005714 descreve apo-proteínas naturais ou variáveis e outras proteínas e peptídeos que possuem uma α -hélice anfipática composta de pelo menos 15 aminoácidos. Estas moléculas inibem a ingestão de colesterol e outros lipídeos pelo intestino.

25 O documento JP 2004/099447 descreve um peptídeo específico com a seqüência de aminoácido Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr, que ocorre na proteína da soja, que pode ser utilizado em produtos alimentícios para possuir um efeito de diminuição de colesterol.

O documento EP 1.046.396 descreve uma composição contendo proteína de soja e esteróis vegetais possuindo efeito sinérgico de diminuição do colesterol. Entretanto, as frações (peptídeos) responsáveis pelo efeito de diminuição do colesterol da proteína da soja não foram descritas.

5 O documento WO 01/37681 descreve uma composição contendo esteróis vegetais e uma proteína hidrossolúvel isolada, tal como a proteína da soja ou o caseinato e, opcionalmente, também um emulsificante. A composição não possui um efeito de diminuição do colesterol adicional comparado aos esteróis vegetais sozinhos. O documento US 6.113.972 descreve um complexo
10 de esteróis vegetais com proteína, onde o complexo aumenta a biodisponibilidade dos esteróis vegetais. Não é atribuído o efeito de diminuição do colesterol à proteína.

O documento 790.060 descreve um complexo de proteína-hidrolisado-fosfolípídeo de soja para diminuir o colesterol do plasma.

15 O documento WO 03/055324 A1 descreve composições contendo esteróis vegetais e hidrolisados de produtos de proteína, preparados pela utilização da preparação da enzima aproteolítica, para diminuir o colesterol do plasma.

O FDA aprovou uma reivindicação à saúde com relação ao papel
20 da proteína da soja na redução do risco de doenças cardiovasculares pela diminuição do colesterol sanguíneo. De modo a se qualificar para esta reivindicação, um alimento deve conter pelo menos 6,25 gramas de proteína de soja por porção, a quantidade sendo um quarto do nível eficaz de 25 gramas por dia.

25 Ainda existe uma necessidade por produtos alimentícios alternativos que compreendem um ingrediente que possui um efeito de diminuição do colesterol sanguíneo. Em particular, ainda existe uma necessidade por produtos alimentícios que compreendem ingredientes que

podem inibir a absorção do colesterol por meio de um mecanismo definido, por exemplo, pela interrupção da formação de micela de colesterol.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

É um objeto da presente invenção fornecer um produto alimentício que compreende os peptídeos que são capazes de inibir a ingestão de colesterol por meio da interferência na formação de micelas. Foi descoberto que os peptídeos apropriados para a utilização nestes produtos alimentícios satisfazem, de preferência, uma série de critérios. Acredita-se que se estes peptídeos forem utilizados nos produtos alimentícios em quantidades específicas, eles contribuem para o controle dos níveis de colesterol sangüíneo. Embora os Depositantes não desejem de forma alguma estarem restritos a qualquer teoria, acredita-se que os peptídeos que satisfazem o critério indicado abaixo interrompem a formação das micelas de colesterol no intestino, evitando ou reduzindo assim a ingestão de colesterol através da parede intestinal.

Conseqüentemente, um primeiro aspecto da presente invenção se refere ao produto alimentício que compreende um peptídeo, dito peptídeo sendo caracterizado por possuir um número de aminoácidos de 6 a 20, e em que o peptídeo é substancialmente insolúvel em água a 20° C e um pH de 6,5, conforme evidenciado por uma aparência túrbida mensurável caso 10 mg do peptídeo for misturado com 10 ml de água desmineralizada a 20° C e pH 6,5 e em que a carga líquida positiva de dito peptídeo é 0, conforme determinado pela somatória das cargas dos aminoácidos individuais de dito peptídeo em pH 6,5, e em que se o peptídeo for o hexa-peptídeo, 6 aminoácidos de dito peptídeo são selecionados a partir do grupo que consiste em A, V, L, I, P, W, F e M.

De preferência, dito peptídeo possui um peso molecular entre 450 e 3.000 Dalton. De preferência, ditos peptídeos são compostos de aminoácidos

hidrofóbicos e neutros, excluindo os aminoácidos carregados negativamente. Também, de preferência, os peptídeos insolúveis em água para a utilização em produtos alimentícios da presente invenção não são β -peptídeos, mas ao invés, são peptídeos contendo aminoácidos comumente presentes em peptídeos de ocorrência natural, por exemplo, α -peptídeos.

De preferência, o produto alimentício é selecionado a partir do grupo que consiste em bebidas, produtos do tipo lácteo, produtos de confeitaria congelados ou espalháveis e margarinas. Da mesma maneira, a quantidade de peptídeos conforme definido acima no produto alimentício é de pelo menos 0,1 g/kg, de preferência, de 1 a 200 g/kg, de maior preferência, de 2 a 30 g/kg.

A presente invenção também se refere à utilização destes produtos alimentícios na preparação de um produto nutricional apropriado para diminuir os níveis de colesterol sanguíneo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os peptídeos para a utilização nos produtos alimentícios de acordo com a presente invenção são insolúveis em água a 20° C e um pH 6,5. Isto pode, por exemplo, ser evidenciado pela mistura de 10 mg do peptídeo em 10 mL de água desmineralizada a 20° C e pH 6,5, e agitação. Uma aparência turbida (mensurável) da solução após agitação é indicativa do fato de que o peptídeo é insolúvel em água.

De preferência, os peptídeos para a utilização nos produtos alimentícios da presente invenção são caracterizados por possuírem um número de aminoácidos de 6 a 20, e por serem compostos de aminoácidos em que substancialmente todos os aminoácidos são aminoácidos hidrofóbicos. Para o propósito da presente invenção, o termo substancialmente todos os aminoácidos significa que todos ou quase todos os aminoácidos são hidrofóbicos, de preferência, a quantidade de aminoácidos não hidrofóbicos é 0.

Ocasionalmente, uma quantidade limitada de aminoácidos não hidrofóbicos de até 30% em peso com base no número de aminoácidos pode ser tolerado por molécula, contanto que o peptídeo resultante seja substancialmente insolúvel em água. Em especial, de preferência todos os aminoácidos no peptídeo são hidrofóbicos.

Para o propósito da presente invenção, os seguintes aminoácidos de ocorrência natural são classificados como aminoácidos hidrofóbicos: alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), triptofano (T), fenilalanina (F), metionina (M).

De preferência, o número de aminoácidos no peptídeo é de 6 a 12, de maior preferência, de 6 a 10 e, de maior preferência, ainda, de 6 a 8.

A carga líquida de um peptídeo pode ser determinada pela somatória das cargas dos aminoácidos individuais do peptídeo em pH 6,5.

Os aminoácidos naturais remanescentes possuem uma carga de 0 em pH 6,5 e são a alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), triptofano (W), fenilalanina (F), metionina (M), glicina (G), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), cisteína (C), glutamina (Q) e aspargina (N).

De preferência, os peptídeos para a utilização nos produtos alimentícios da presente invenção compreendem por molécula pelo menos 3, de maior preferência, pelo menos 4 e, de maior preferência, ainda, substancialmente todos os aminoácidos selecionados a partir do grupo de A, V, L, I, P, W e M.

De preferência, os peptídeos para a utilização no produto alimentício da presente invenção não compreendem quaisquer aminoácidos carregados negativamente, tal como o ácido aspártico (D) e o ácido glutâmico (E).

Os exemplos dos peptídeos preferidos são os octa-peptídeos hidrofóbicos, em que 7 a 8 aminoácidos são selecionado a partir do grupo de A,

V, L, I, P, W, F e M.

Os exemplos específicos de peptídeos apropriados são apresentados nas Tabelas 1 e 3.

TABELA 1

Exemplos de peptídeos insolúveis em água para a utilização em produtos alimentícios de acordo com a presente invenção	
Peptídeo	Seqüência de aminoácido
I	AAAAAA
II	AAAAAAA
III	LLLLLL
IV	LLLLLLL

5 Os peptídeos podem ser obtidos ou fabricados por qualquer método conhecido no estado da técnica, incluindo a síntese de peptídeos puros.

Os produtos alimentícios de acordo com a presente invenção são, de preferência, selecionados a partir do grupo que consiste em bebidas, produtos do tipo lácteo, produtos de confeitaria congelados ou espalháveis/ margarina. A quantidade de peptídeos no produto alimentício é, de preferência, 10 pelo menos 0,1 g/kg, de maior preferência, de 1 a 200 g/ kg, de maior preferência, de 2 a 30 g/kg. Estes tipos preferidos de produtos alimentícios são descritos com alguns detalhes abaixo.

De preferência, a quantidade de peptídeos nestes produtos 15 alimentícios é selecionada tal que, por porção, uma quantidade de 0,1 a 10 gramas de peptídeos está presente. Os tamanhos de porção apropriados estão indicados na Tabela 2.

<u>TABELA 2 -TAMANHOS DE PORÇÃO APROPRIADOS</u>	
Produto alimentício	Tamanho da porção
Suco de fruta	200 g
Bebida do tipo láctea	125 g

<u>TABELA 2 -TAMANHOS DE PORÇÃO APROPRIADOS</u>	
Produto alimentício	Tamanho da porção
Iogurte	125 g
Produto de confeitaria congelado	75 g
Espalhável	15 g
Molho	40 g
Barra	60 g

PRODUTOS DE SUCO DE FRUTA

Os exemplos de produtos de suco de fruta de acordo com a presente invenção são sucos derivados de frutas cítricas como laranja e toronja (*grapefruit*), frutas tropicais, banana, pêssago, pêra, morango, às quais os peptídeos e, opcionalmente, um ou mais ingredientes saudáveis ao coração são adicionados.

PRODUTOS DO TIPO LÁCTEOS

Os exemplos de produtos do tipo lácteo de acordo com a presente invenção são o leite, espalháveis lácteos, *cream cheese*, bebidas do tipo láctea e iogurte, para os quais os peptídeos e, opcionalmente, um ou mais ingredientes saudáveis para o coração são adicionados.

O produto alimentício pode ser utilizado como tal como uma bebida do tipo láctea. Alternativamente, o sabor ou outros aditivos podem ser utilizados. Um produto do tipo lácteo também pode ser produzido pela adição dos peptídeos na água ou a um produto lácteo.

Um exemplo de uma composição para um produto do tipo iogurte é de cerca de 50 a 80% em peso de água, de 1 a 10% em peso de peptídeos e, opcionalmente, um ou mais ingredientes saudáveis para o coração, de 0 a 15% em peso de pó de soro lácteo, de 0 a 15% em peso de açúcar (por exemplo, sacarose), de 0,01 a 1% em peso de cultura de iogurte, de 0 a 20% em peso de fruta, de 0,05 a 5% em peso de vitaminas e minerais, de 0 a 2%

em peso de sabor, de 0 a 5% em peso de estabilizante (espessante ou agente gelificante). Para o iogurte, pode ser adicionada a fruta.

Um tamanho de porção típico para um produto do tipo iogurte poderia ser de 50 a 250 g, em geral de 80 a 200 g.

5

PRODUTOS DE CONFEITARIA CONGELADOS

Para o propósito da presente invenção, o termo produto de confeitaria congelado inclui confeitos congelados contendo leite, tais como sorvetes, iogurtes congelados, *sherbet*, *sorbet*, sorvete de água e creme de ovos congelado, geladinhos, granitas e purês de fruta congelados.

10

De preferência, o nível de sólidos no confeito congelado (por exemplo, açúcar, gordura, flavorizante, etc) é de mais de 3% em peso, de maior preferência, de 10 a 70% em peso, por exemplo, de 40 a 70% em peso.

15

O sorvete irá compreender tipicamente de 0 a 20% em peso de gordura, de 1 a 10% em peso de peptídeos e, opcionalmente, um ou mais ingredientes saudáveis ao coração, adoçantes, de 0 a 10% em peso de componentes do leite não gordurosos e componentes opcionais, tais como emulsificantes, estabilizantes, conservantes, ingredientes flavorizantes, vitaminas, minerais, etc, sendo o balanço de água. Tipicamente, o sorvete será aerado, por exemplo, a uma expansão de 20 a 400%, mais específico de 40 a 200% e congelado a uma temperatura de -2 a -200° C, mais específico de -10 a -30° C. O sorvete compreende normalmente cálcio em um nível de cerca de 0,1% em peso.

20

EMULSÕES CONTENDO ÓLEO E ÁGUA

25

Vantajosamente, o produto alimentício é uma emulsão contendo óleo e água, por exemplo, um espalhável ou uma margarina. A emulsão óleo e água é definida no presente como uma emulsão compreendendo óleo e água e inclui emulsões óleo-em-água (o/w) e água-em-óleo (w/o) e emulsões mais complexas, por exemplo, emulsões água-em-óleo-em-água (w/o/w/o/w). O óleo

é definido no presente como incluindo gordura.

De preferência, um espalhável de acordo com a presente invenção compreende de 30 a 90% em peso de óleo vegetal, de 1 a 5% em peso de peptídeos e, opcionalmente, um ou mais ingredientes saudáveis ao coração adicionais em quantidades apropriadas. Vantajosamente, um
5 espalhável possui um pH de 4,2 a 6,0.

Um exemplo de uma composição de um espalhável é 37,45% em peso de uma mistura de gordura, 52,8% em peso de água, 0,15% em peso de lecitina, 0,2% em peso de monoglicerídeo, 0,1% em peso de sabor, 0,5% em
10 peso de cloreto de sódio, 0,1% em peso de sorbato de potássio, 0,1% em peso de pó de soro do leite doce, 6% em peso de amido, 2,5% em peso de peptídeos.

OUTROS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

Outros produtos alimentícios de acordo com a presente invenção
15 podem ser preparados por um técnico no assunto, com base no conhecimento comum geral, os peptídeos e, opcionalmente, um ou mais ingredientes saudáveis para o coração em quantidades apropriadas. Os exemplos de tais produtos alimentícios são assados, lanches, molhos, barras, etc.

Os produtos alimentícios da presente invenção contêm, de
20 preferência, ainda, ingredientes saudáveis ao coração. Particularmente preferida é a utilização de esteróis, tais como, por exemplo, fitosteróis ou fitostanóis, nos produtos alimentícios da presente invenção. Os esteróis preferidos para a utilização nos produtos alimentícios da presente invenção são descritos com mais detalhes abaixo. Para o propósito da presente invenção, o
25 termo esteróis se refere aos esteróis, estanóis, seus análogos e seus ésteres.

FITOSTERÓIS, FITOSTANÓIS, ANÁLOGOS E DERIVADOS

Tipicamente, os fitosteróis, fitostanóis e seus análogos e derivados podem ser selecionados a partir de um ou mais fitosteróis,

fitostanóis, análogos sintéticos de fitosteróis e fitostanóis e derivados esterificados de qualquer um dos anteriores, e a misturas dos mesmos. A quantidade total de tais substâncias em um produto alimentício é, de preferência, de 0,01% a 20%, de maior preferência, de 0,1% a 15%, de maior
5 preferência, ainda, de 0,2% a 8% e, de maior preferência, ainda, de 0,3% a 8% em peso da composição do produto alimentício.

De preferência, a ingestão por porção de tal componente do tipo esterol da combinação é de 0,1 g a 3 g, de maior preferência, de 1,5 g a 2,5 g, em especial, de 2 g a 2,25 g por porção.

10 Os fitosteróis, também conhecidos como esteróis vegetais ou esteróis de plantas podem ser classificados em três grupos, 4-desmetilsteróis, 4-monometilesteróis e 4,4'-dimetilesteróis. Nos óleos eles existem principalmente como esteróis livres e ésteres de esteróis de ácidos graxos embora os glicosídeos de esterol e os glicosídeos de esterol acilados também
15 estejam presentes. Há três fitosteróis principais denominados β -sitosterol, stigmasterol e campesterol. Os fitostanóis são os respectivos derivados saturados de 5 α - de fitosteróis, tais como o sitostanol, campestanol e seus derivados.

Os análogos sintéticos de quaisquer dos fitosteróis ou fitostanóis
20 (que incluem os fitosteróis ou fitostanóis naturais quimicamente modificados) podem ser utilizados.

De preferência, o fitosterol ou fitostanol é selecionado a partir do grupo que consiste em éster de ácido graxo de β -sitosterol, β -sitostanol, campesterol, campestanol, stigmasterol, stigmastanol e suas misturas.

25 Os materiais de fitosterol ou fitostanol opcionais citados acima podem ser opcionalmente fornecidos na forma de um ou mais de seus ésteres de ácido graxo. As misturas de materiais esterificados e não esterificados também pode ser utilizada.

Portanto, qualquer um dos esteróis, por exemplo, fitosteróis ou fitostanóis e seus análogos sintéticos utilizados na presente invenção são, de preferência, esterificados com um ácido graxo. De preferência, eles são esterificados com um ou mais ácidos graxos C_2-C_{22} . Para o propósito da presente invenção, o termo ácido graxo C_2-C_{22} se refere a qualquer molécula que compreende uma cadeia principal C_2-C_{22} e pelo menos um grupo ácido. Embora não preferido dentro do presente contexto, a cadeia principal C_2-C_{22} pode conter de 1 a 6 ligações duplas, ser parcialmente substituída ou pode estar presente cadeias laterais. Entretanto, de preferência, os ácidos graxos C_2-C_{22} são moléculas lineares que compreendem um ou dois grupo(s) ácido(s) como grupo(s) final(is). Os ácidos graxos C_8-C_{22} lineares de maior preferência podem ocorrer nos óleos líquidos naturais.

De preferência, os produtos alimentícios da presente invenção compreendem uma combinação de peptídeos conforme descrito acima e esteróis, em que a proporção em peso de peptídeos para esteróis é de 100: 1 para 1: 50, de maior preferência, de 50: 1 para 1: 30, de maior preferência, ainda, de 5: 1 para 1: 15.

A presente invenção será ainda ilustrada nos exemplos seguintes.

EXEMPLO 1

MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS

Peptídeos sintéticos.

Os peptídeos sintéticos de acordo com a presente invenção podem ser fabricados por qualquer método sintéticos conhecido no estado da técnica.

Avaliação do efeito dos peptídeos na solubilidade do colesterol em micelas misturadas.

O colesterol é um composto hidrofóbico, que é insolúvel em água e forma cristais em um ambiente aquoso. Esta propriedade torna difícil para o

colesterol se mover do lúmen em direção à membrana de borda em escova no intestino, onde o colesterol é ingerido pelos enterócitos. No lúmen intestinal, moléculas anfifílicas, tais como os monoacilgliceróis (MAG), os ácidos graxos livres (FFA) e os lisofosfolípídeos (LPL), são geradas por meio da hidrólise enzimática dos alimentos. Os ácidos biliares, fosfolípídeos (PL) e o colesterol livre são secretados no duodeno a partir da vesícula biliar. Estes compostos (ácidos biliares, FFA, MAG, PL, LPL e colesterol) podem formar uma estrutura denominada micelas alimentares misturadas. As micelas alimentares misturadas podem dissolver o colesterol hidrofóbico para evitar a cristalização em um ambiente aquoso.

Portanto, as micelas de colesterol alimentares misturadas desempenham um papel importante na absorção do colesterol, por meio da ação como veículos que transportam colesterol em direção à parede intestinal.

Para formar micelas *in vitro*, 0,1 mM de lecitina, 0,05 mM de monooleína, 0,1 mM de ácido oléico e 80 μ M de colesterol são misturados em um tubo teste e secos em uma corrente de N₂. Após a secagem, uma mistura de ácido biliar de 2 mM (mistura BA) em PBS pH 6,5 é adicionada a esta mistura de lipídeo. O colesterol marcado fluorescente (NBD-colesterol) é utilizado para monitorar a incorporação de colesterol nas micelas misturadas.

Para teste, os peptídeos (1 mg/ ml), conforme indicado na Tabela 3, são adicionados à mistura BA e então misturados com misturas de lipídeos conforme descrito. Toda a mistura é agitada em vórtex por 15 segundos, seguido por um tratamento ultrassônico em um banho de água por 30 minutos. Para esta mistura, uma amostra é tomada como medida da concentração total de colesterol NBD. A solução de micela restante é centrifugada em uma ultracentrífuga de mesa a 50.000 g por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a centrifugação, as amostras do sobrenadante são tomadas para a determinação de um colesterol NBD solubilizado, que indica a

quantidade de colesterol incorporado nas micelas misturadas. O *pellet* contendo colesterol cristalizado é descartado. O colesterol NBD é medido a 375/ 465 nm utilizando um leitor de prato fluorescente.

As misturas de micela misturadas não contendo peptídeos são utilizadas como controle (100%). Para cada exemplo, a porcentagem de colesterol incorporado é calculada ao dividir a quantidade de colesterol incorporado na composição teste pela quantidade de colesterol incorporado na amostra controle.

A Tabela 3 apresenta para diversos peptídeos a porcentagem de incorporação de colesterol em micelas misturadas. Esta tabela também indica quais peptídeos são substancialmente insolúveis em água a 20° C e pH 6,5.

TABELA 3

O EFEITO INIBIDOR DE PEPTÍDEOS INSOLÚVEIS EM ÁGUA NA INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL EM MICELAS MISTURADAS

Categoria de peptídeos	Seqüência de aminoácidos	Incorporação de colesterol % do controle
Sem peptídeos (controle)	-	100
Peptídeos insolúveis em água	AAAAAA	34
	AAAAAAA	50
	LLLLLL	26
Partículas solúveis	VEWEME	87
	EAEWEY	86
	GSGGSG	90
	DDDDDD	155

Conclusão: foi descoberto que os peptídeos insolúveis em água, de preferência, compostos de aminoácidos hidrofóbicos são capazes de inibir a incorporação de colesterol em micelas misturadas.

EXEMPLO 2

Produtos alimentícios de acordo com a presente invenção.

Exemplo 3a: 0,3 g de hexa-peptídeo AAAAAA foi misturado em um iogurte de fruta disponível comercialmente de 125 gramas de porção.

5 Exemplo 3b: 0,5 g de octa-peptídeo LLLLLLLL e 3 g de um esterol éster (β -sitosterol esterificado com óleo de girassol) foi adicionado a uma bebida de iogurte disponível comercialmente de 200 g de porção.

REIVINDICAÇÕES

1. PRODUTO ALIMENTÍCIO, que compreende um peptídeo, dito peptídeo que possui um número de aminoácidos de 6 a 20, e em que o peptídeo é substancialmente insolúvel em água a 20° C e um pH de 6,5, conforme evidenciado por uma aparência turbida mensurável caso 10 mg do peptídeo for misturado com 10 ml de água desmineralizada a 20° C e pH 6,5 e em que a carga líquida positiva de dito peptídeo é 0, conforme determinado pela somatória das cargas dos aminoácidos individuais de dito peptídeo em pH 6,5, e em que se o peptídeo for o hexa-peptídeo, 6 aminoácidos de dito peptídeo são selecionados a partir do grupo que consiste em A, V, L, I, P, W, F e M.

2. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito peptídeo possui um número de aminoácidos de 6 a 12, de maior preferência, de 6 a 10 e, de maior preferência, ainda de 6 a 8.

3. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito peptídeo possui um peso molecular de 450 a 3.000 Dalton.

4. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, em que o peptídeo é substancialmente composto de aminoácidos hidrofóbicos selecionado a partir do grupo de F, A, L, M, I, W, P e V.

5. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de o peptídeo ser um octa-peptídeo e por molécula de dito peptídeo, pelo menos 7, de preferência, 8 aminoácidos são selecionado a partir do grupo de A, V, L, I, P, W, F e M.

6. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, selecionado a partir do grupo que consiste em bebidas,

produtos do tipo lácteo, produtos de confeitaria congelados e espalháveis ou margarinas.

7. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, e ainda compreende os esteróis em uma quantidade
5 0,01% a 20%, de maior preferência, de 0,1% a 15%, de maior preferência, ainda, de 0,2% a 8% e, de maior preferência, ainda, de 0,3% a 8% em peso.

8. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 7, em que a proporção em peso de peptídeos para esteróis é de 100: 1 para 1: 50, de maior preferência, de 50: 1 para 1: 30, de maior preferência, ainda, de 5: 1 para 1: 15.
10

9. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de a quantidade de ditos peptídeos no produto alimentício ser de pelo menos 0,1 g/kg, de maior preferência, de 1 a 200 g/kg e, de maior preferência, ainda, de 2 a 30 g/kg.

15 10. USO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 9, na preparação de um produto nutricional apropriado para diminuir os níveis de colesterol sangüíneo.

RESUMO**"PRODUTO ALIMENTÍCIO E USO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO"**

A presente invenção se refere a um produto alimentício que compreende um peptídeo, dito peptídeo sendo caracterizado por possuir um
5 número de aminoácidos de 6 a 20 e, em que o peptídeo é substancialmente insolúvel em água a 20° C e um pH de 6,5, conforme evidenciado por uma aparência turbida mensurável caso 10 mg do peptídeo for misturado com 10 ml de água desmineralizada a 20° C e pH 6,5 e em que a carga líquida positiva de dito peptídeo é 0, conforme determinado pela somatória das cargas dos
10 aminoácidos individuais de dito peptídeo em pH 6,5, e em que se o peptídeo for o hexa-peptídeo, 6 aminoácidos de dito peptídeo são selecionados a partir do grupo que consiste em A, V, L, I, P, W, F e M.