



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**SAMANTHA ALVES DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS  
PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE CAPRINO**

João Pessoa

2018

**SAMANTHA ALVES DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS  
PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE CAPRINO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Tatiane Santi Gadelha

João Pessoa

2018

---

SAMANTHA ALVES DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS  
PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE CAPRINO

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas, como requisito  
parcial à obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal da Paraíba.

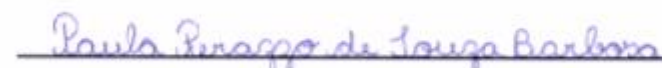
BANCA EXAMINADORA:



Dra. Tatiâne Santi Gadelha, Doutora,  
Universidade Federal da Paraíba



Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior,  
Doutor, Universidade Federal da Paraíba



Msc. Paula Perazzo de Souza Barbosa  
Universidade Federal da Paraíba

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L732c Lima, Samantha Alves de.

Caracterização proteica e atividade antibacteriana das proteínas do soro do leite caprino / Samantha Alves de Lima. - João Pessoa, 2018.

39 f. : il.

Orientação: Tatiane Santi Gadelha.

Coorientação: Maria Isabel Ferreira Campos.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Ciências biológicas. 2. Leite caprino. 3. Perfil proteico. I. Gadelha, Tatiane Santi. II. Título.

UFPB/CCEN

*Dedico este trabalho ao meu Deus por me dar forças para superar todos os desafios e aos meus pais, por todo o apoio e amor durante toda a minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha força para fazer com que eu alcançasse os meus objetivos, junto a realização de um sonho e me manter firme nos momentos que cheguei a ter medo. Foram tantas turbulências que eu sei que só consegui superar graças à fé.

Agradeço aos meus pais, por sempre apoiarem as minhas decisões, pelo companheirismo, por me darem motivação em momentos que jurei que não teria mais forças. Obrigada pelas noites que me faziam companhia em momentos de estudo, pela dedicação de me ajudar a ter um dia mais confortável. Sou eternamente grata a vocês, pois essa vitória não é minha, é nossa.

A minha família que me apoiou e sente orgulho pela pessoa que me tornei. Em especial meu tio, Antônio e meus avós, Maria Ferreira, Maria da Penha e Antônio Reis. Vocês me ajudaram a tornar este sonho uma realidade.

A José Odepsson, meu namorado e companheiro do dia a dia, que por várias noites ajudou-me a permanecer acordada para conseguir finalizar trabalhos ou estudar, por me motivar e me aconselhar nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora, a professora Tatiane Santi Gadelha, por ter sido como uma mãe na minha vida acadêmica, por todos os anos de orientação, me abrindo as portas do laboratório para que eu pudesse começar meu caminho na ciência. Durante esses três anos no laboratório aprendi muito graças a senhora, espero que o destino ainda me permita aprender mais. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos e por toda a compreensão.

Aos colegas de laboratório, tanto como BioGeR e Laprote, que durante toda a finalização deste trabalho e durante três anos cada um, a sua maneira contribuiu para a minha formação. Agradeço em especial aos que acompanharam o final dessa jornada. Obrigada Bel, Paula, Joanderson e Karol, por ajudarem no dia-a-dia e garanto que só a presença de vocês já mudava o meu dia.

Ao professor Carlos Alberto pela ajuda e colaboração com os trabalhos realizados no laboratório.

As doutorandas, Maria Isabel e Paula. Bel lhe agradeço por ser minha co-orientadora e me ajudar com todo esse trabalho, sem a sua ajuda meu sonho não estaria sendo. Paula obrigada por todo o companheirismo e ajuda muitos dias no laboratório foram especiais graças a sua presença.

Aos meus amigos que a UFPB me presenteou que me ajudaram de forma direta e indireta, desde uma dúvida tirada em aula a um sorriso largo. Em especial a Romário, Thainá, Leandersson, Ruth e Juliane, por todas as risadas e apoio.

As minhas amigas de infância, que infelizmente o tempo não deixou ficar tão presente nas suas vidas, porém sempre carregou vocês no coração, com um imenso carinho. Obrigada Karina, Joyce, Cynthia e Valderlane por estarem na minha vida.

Ao grupo Tenda de Teatro, graças à arte pude descobrir um lado descontraído para aliviar a tensão da graduação e me permitir. Agradeço ao Geraldo Jorge e ao Paulo Raulino que foram meus diretores e entenderam que eu tinha uma agenda apertada para os ensaios e apresentações. Grata por toda compreensão e ensinamentos.

Por fim, agradeço a todos que da maneira mais simples ou grandiosa ajudaram com a conclusão desses quatro anos de curso e por me tornarem uma pessoa melhor.

## RESUMO

O soro do leite caprino é um subproduto de grande importância para a indústria alimentícia e farmacêutica. As proteínas possuem uma sequência de aminoácidos em sua composição, assim como peptídeos obtidos pelo processo de hidrólise enzimática, atividades biológicas como a inibição do crescimento e a proliferação bacteriana. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar as proteínas presentes no soro do leite de cabra, obter peptídeos bioativos através da hidrólise com pepsina com variação do pH e o tempo e verificar a atividade antibacteriana. O soro do leite foi obtido por meio de precipitação ácida, centrifugado e liofilizado para realizar as análises. A identificação do perfil das proteínas foi realizada por SDS-PAGE, a identificação dos peptídeos foi realizada por SDS-PAGE Tricina, o grau de hidrólise foi avaliado pelo método de OPA, a CIM da atividade antibacteriana foi avaliada frente às cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Pelo método de OPA mostrou que os hidrolisados possuem potencial de bioatividade pois quando aplicado estatisticamente seu grau de hidrólise é superior a 10%. A concentração inibitória mínima (CIM) das proteínas do leite sobre as bactérias quando analisadas estatisticamente verificou-se que a melhor CIM ocorreu para bactérias Gram-positivas, e frente às cepas das Gram-negativas com menor grau de inibição. Os resultados mostram que o tempo de reação enzimática foi o critério que mais atuou sobre a hidrólise e o soro do leite possui ação inibitória contra as bactérias testadas.

**PALAVRAS CHAVE:** leite caprino, perfil protéico, hidrolisados, CIM.

## ABSTRACT

Goat's milk is a by-product of great importance for the food and pharmaceutical industry. Proteins have an amino acid sequence in their composition, as well as peptides obtained by the enzymatic hydrolysis process, biological activities such as inhibition of growth and bacterial proliferation. Thus, the objective of this work was to characterize as proteins present in the whey of goat milk, to obtain bioactive peptides through hydrolysis with pepsin with pH and time variation and to verify an antibacterial activity. The whey of the milk was obtained by means of acid precipitation, centrifuged and lyophilized to perform the analyzes. Protein profile identification was performed by SDS-PAGE, peptide identification was performed by SDS-PAGE Tricine, the degree of hydrolysis was evaluated by the OPA method, the MIC of the antibacterial activity was evaluated against the strains of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The OPA method showed that hydrolysates have bioactivity potential because when applied statistically their degree of hydrolysis is higher than 10%. The minimum inhibitory concentration (MIC) of milk proteins on bacteria when analyzed statistically showed that the best MIC was observed for Gram-positive bacteria, and against Gram-negative strains. The results show that the time of enzymatic reaction was the criterion that most acted on the hydrolysis and the serum of the milk has an inhibitory action against the bacteria tested.

**KEYWORD:** goat'smilk, protein profile, hydrolyzate, MIC.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Capra hircus</i> , com alto grau sanguíneo da raça Alpina .....	22
<b>Figura 2</b>	Perfil proteico do soro do leite de cabra em SDS-PAGE.....	27
<b>Figura 3</b>	Análise dos hidrolisados do soro do leite caprino, obtidos por meio da hidrolise enzimática .....	29

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Tempo e pH utilizados para a hidrólise com Pepsina.....	24
<b>Tabela 2</b>	Valores referentes do grau de hidrólise, pelo método de OPA.....	28
<b>Tabela 3</b>	Concentração Inibitória Mínima - CIM e % de inibição do soro do leite de cabra.....	30
<b>Quadro 1</b>	Produção de caprinos nos principais estados do Nordeste brasileiro.....	15

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	1 Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado por 24 h frente as cepas de <i>Salmonella spp.</i> ....	31
<b>Gráfico 2</b>	Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado por 24 h frente as cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	32
<b>Gráfico 3</b>	Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado por 24 h frente as cepas de <i>Lysteria monocytogenes</i> .....	32
<b>Gráfico 4</b>	Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado por 24 h frente as cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9124...	33

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -La - alfa lactalbumina

$\beta$ - LG - Beta lactoglobulina

Albs - Albumina sérica

BSA - Albumina Sérica Bovina

CIM - Concentração Inibitória Mínima

IgG - Imunoglobulina

kDa - Unidade Massa Atômica

LF - Lactoferrina

LP - Lactoperoxidase

PrP - Proteose-peptona

OPA - O-ftaldialdeído

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
2.1 Caprinocultura.....	15
2.2 Leite De Cabra .....	16
2.3 Soro Do Leite De Cabra .....	16
2.4 Proteínas Do Soro Do Leite.....	17
2.5 Peptídeos Bioativos.....	18
2.6 Bactérias Patogênicas De Interesse Alimentar.....	19
2.6.1 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.6.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
2.6.3 <i>Salmonella spp.</i> .....	20
2.6.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivo Geral .....	21
3.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	22
4.1 Obtenção e Preparação do Leite Caprino .....	22
4.2 Obtenção do Soro de Leite .....	23
4.3 Determinação do Teor Proteico Solúvel .....	23
4.4 Hidrolise Enzimática <i>In Vitro</i> do Soro do Leite Caprino.....	23
4.5 Identificação das Proteínas Solúveis e dos peptídeos nos hidrolisados soro do leite caprino.....	24
4.6 Atividade Antibacteriana.....	25
4.7 Análise Estatística.....	25
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1 Quantificação de Proteínas Solúveis .....	26
5.2 Identificação das Proteínas Solúveis do Soro do Leite de Cabra.....	26
5.3 Hidrólise Enzimática .....	27
5.4 Identificação dos peptídeos do soro do leite.....	28
5.5 Atividade Antibacteriana .....	29
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	34
<b>7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

Os caprinos são animais mamíferos ruminantes, que possuem como base de sua alimentação, as plantas. Para a sociedade, esses animais são importantes devido ao seu valor econômico, pois há a comercialização de seu couro para a fabricação de vestimentas, calçados e acessórios, carne e leite, além de serem animais rústicos que se desenvolvem bem em ambientes com pouca disponibilidade de alimentos e água. A região do Nordeste do Brasil possui destaque na criação de caprinos, com um efetivo de cerca de 90% do rebanho nacional (BRASIL, 2000; BRASIL, 2013).

O leite caprino é um fluído viscoso produzido pelas glândulas mamário, bastante nutritivo, com boa digestibilidade, por possuir glóbulos de gorduras menores que o leite bovino, por possuir menor alergenicidade é indicado para crianças que possuem alergias ao leite bovino. Devido aos seus benefícios nutricionais, o leite e seus derivados vêm recebendo destaque no mercado consumidor, pois possuem sabor e aroma singulares (CENACHI et al., 2011).

O soro do leite pode ser obtido por meio da produção de queijos ou da separação da caseína. O uso do soro em pesquisas colabora com a diminuição de impactos ambientais, já que é considerado um poluente devido à elevada concentração de substâncias orgânicas. Além de o seu alto valor nutricional colaborar com a saúde humana, o soro do leite possui proteínas que exercem ação biológica, como atividade antibacteriana, e por meio dessas proteínas podem-se obter peptídeos bioativos por meio da sua hidrólise enzimática (ALVES et al., 2014; KORHONEN; PIHLANT, 2006).

Apesar da riqueza em proteínas, os estudos sobre as funções biotecnológicas das proteínas do soro do leite caprino são ainda pouco explorados, possuindo maior campo de estudos as proteínas do leite bovino.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

### 2.1 Caprinocultura

A caprinocultura é uma fonte para alimentação de uma boa parcela dos brasileiros, em especial para a população do Nordeste que vive na seca (BRASIL, 2007). Em 2016, a população mundial de caprinos correspondia cerca de 1,13 bilhões, sendo distribuída por todos os continentes, entretanto nota-se que a maior parte do rebanho caprino se encontra em países que estão se desenvolvendo (FAO, 2016).

Segundo dados do IBGE, no ano de 2016, foram contabilizados no Brasil o rebanho caprino em 9,78 milhões. A maior parte é contabilizada na região do Nordeste (quadro 1) com as maiores percentagens na Bahia (28,0%) e em Pernambuco (25,5%).

No Brasil, devido ao clima e da vegetação que se encontra no semiárido nordestino, a região do Nordeste é onde se destaca a caprinocultura, com mais de 90% do rebanho nacional, sendo importante socialmente, economicamente e culturalmente para os nordestinos, pois através do uso dos caprinos, é possível a obtenção de alimento e o sustento de muitas famílias (BRASIL, 2016; COSTA et al., 2008).

**Quadro 1-** Produção de caprinos nos principais estados do Nordeste brasileiro

<b>Estados</b>	<b>Rebanho Caprino</b>	<b>% Rebanho Nacional</b>
Bahia	2.742.733	28,0 %
Pernambuco	2.492.388	25,5 %
Piauí	1.228.950	12,6 %
Ceará	1.134.141	11,6 %
Paraíba	566.153	5,8%
Rio Grande do Norte	452.836	4,6 %
Maranhão	374.249	3,8 %

Fonte: IBGE (2016)

## 2.2 Leite de cabra

O leite de cabra é caracterizado como um fluido biológico, sendo um alimento nutritivo, por possuir na sua composição química: proteínas, carboidratos, gordura, vitaminas e sais minerais. Seus nutrientes podem variar de acordo com fatores que interferem na espécie, tais como a nutrição, raça, tempo de lactação, variabilidade genética dos indivíduos e o estado de cada animal. Diante disso, é um alimento que pode ser utilizada pela população, devido ao alto valor nutricional da sua composição (ARAÚJO, 2017).

Por apresentar glóbulos de gorduras com diâmetros menores e não possuir a substância aglutinina, o leite caprino torna-se mais digestivo em comparação ao leite bovino. Além do valor nutricional propriamente dito, o leite caprino é indicado para crianças com alergia à proteína do leite bovino, pois comparando ambos os leites, o de cabra possui alergenicidade menor aos humanos, em virtude de possuir menor presença da fração alfa-S1 da caseína (CATUNDA et al., 2016 e MADUREIRA et al., 2017).

O leite caprino e seus derivados possuem um destaque promissor para o mercado dos produtos lácteos, pois além de possuírem propriedades que contribuem para a alimentação saudável, os alimentos possuem qualidades específicas como o seu sabor. Sendo uma ótima alternativa para a diversificação da alimentação (CATUNDA et al., 2016).

## 2.3 Soro do leite caprino

O soro do leite é um subproduto, que pode ser obtido por métodos realizados em laboratório e indústrias. As principais técnicas que são utilizadas para obtenção do soro são: a precipitação isoelétrica que irá resultar no soro ácido e na caseína ácida; coagulação enzimática que por meio dessa técnica produz o soro doce e na caseína coagulada; e a separação física da micela de caseína, técnica que utiliza da filtração para obter a concentração das micelas e o soro do leite (ALVES et al., 2014).

Na produção de queijo, o soro do leite corresponde aproximadamente 90% do volume de leite utilizado, no qual esta percentagem representa cerca 55% dos componentes nutritivos do leite. Devido ao seu alto teor proteico, o soro pode ser utilizado para fins diversos, como na indústria alimentícia, farmacêutica ou de

cosméticos (ALVES et al., 2014; BRANDELLI, DAROIT e CORRÊA, 2015).

#### 2.4 Proteínas do soro do leite

O soro equivale cerca de 60 % do valor nutricional do leite, em sua composição química há proteínas que são importantes para a nutrição e funções biológicas. As principais proteínas que estão presentes no soro do leite são  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidase e albumina sérica, imunoglobulinas (HARAGUCHI, ABREU, PAULA, 2006; MADUREIRA et al., 2007; YADAV, 2015).

A composição das proteínas do soro do leite pode sofrer alterações de acordo com o método que é utilizado para sua obtenção. As proteínas do soro são obtidas através da produção de queijos, no processo de separação do soro do leite e da caseína. No leite bovino o soro corresponde a 20%, enquanto que no leite humano fica na faixa dos 80 a 50 %, dependendo do momento de lactação (HARAGUCHI, ABREU, PAULA, 2006). A solubilidade dessas proteínas pode ser dada em diferentes pH, sua estrutura é globular e possuem estabilidade estrutural devido as pontes de dissulfeto na sua estrutura (ALVES et al., 2014).

A proteína  $\beta$ -lactoglobulina possui conformação globular de massa molecular de 18.362 kDa. No leite bovino esta proteína que está mais presente em termos de abundância, entretanto no soro do leite humano a sua abundância é basicamente nula. A  $\beta$ -lactoglobulina possui funções que são importantes para a indústria alimentícia, devido a seu potencial de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor (IAMETTI et al., 1996 ; MADUREIRA, 2007; SGARBIER, 2004).

A  $\alpha$ -lactoalbumina é uma metaloproteína, proteína que está presente na maioria do leite dos animais. Sua massa molecular tem o valor aproximado de 14,0 kDa e sua estrutura é globular, nela possui grandes quantidades de triptofano. Através da  $\alpha$ -lactoalbumina são obtidos os peptídeos ricos em triptofano (FERREIRA, 2001; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011).

A lactoferrina é uma glicoproteína, secretada pelos neutrófilos, ela pode ser encontrada no leite, saliva e muco. É uma proteína pela qual pode se ligar ao ferro, podendo transportar e estocar. Com essa função a lactoferrina acaba inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, pois algumas necessitam de ferro para o seu crescimento e reprodução (TORTORA, 2012).

Em estudos com o soro do leite de vaca, a lactoferrina possui atividade biológica, atuando na inibição da proliferação e crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ao realizar o procedimento de hidrólise enzimática, há a liberação de peptídeos que possuem o potencial inibitório, além do seu potencial contra o vírus, os peptídeos possuem ação contra a bactéria *Helicobacter pylorie* ação anticoagulante (KRISSANSEN, 2007; SGARBIER, 2004).

A lactoperoxidase possui propriedades que atuam com a ação bactericida através da oxidação tiocianatos na presença de peróxido de hidrogênio (SGARBIER, 2004). A albumina sérica corresponde aproximadamente a 10% das proteínas presente no soro do leite, é uma proteína de alto peso molecular, possuindo 66,26 kDa, ela favorece o transporte de lipídeos na corrente sanguínea por possuir afinidade com os mesmos (HARAGUCHI, ABREU, DE PAULA, 2006; YADAV, 2015).

## 2.5 Peptídeos bioativos

Os peptídeos bioativos são fragmentos protéicos curtos que exercessem influência na saúde e possuem efeitos positivos na fisiologia do corpo. Diversos peptídeos foram encontrados em produtos derivados do leite (ATANASOVA, IVANIVA, 2014).

A produção de peptídeos bioativos pode ser realizada através do uso de proteínas que estão presentes no leite, devido não possuir bioatividade quando estão na sequência original da proteína, um dos métodos de se obter esses peptídeos bioativos é a hidrólise enzimática, que é um procedimento comum para a produção de peptídeos biologicamente ativos, muito desses peptídeos conhecidos tiveram sua produção através do uso de enzimas gastrointestinais, que para esse método geralmente é utilizada as enzimas pepsina e tripsina (KORHONEN; PIHLANT, 2006). A Hidrólise tem a sua avaliação para caracterização dos peptídeos que foram obtidos através de alguns métodos como a eletroforese em gel de poliacrilamida, espectrometria de massas, cromatografia em fase reversa (KRÜGER, 2006).

## 2.6 Bactérias patogênicas de interesse alimentar

### 2.6.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* é uma espécie Gram-negativa, presente na microbiota intestinal de animais, como mamíferos e aves. Essa espécie de bactéria é geralmente isolada de alimentos e derivados do leite (CAMPOS et al., 2006).

*E. coli* apresenta grande interesse para a medicina, pois é um agente patogênico de algumas infecções, como urinárias, intestinais e meningite. Essa espécie de bactéria é encontrada no ambiente com fezes de animais, água sem tratamento sanitário e no solo (BRASIL, 2010).

### 2.6.2 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é uma espécie de bactéria Gram-positiva, classificada como cocobacilo, é uma bactéria patogênica, pelo motivo de existir a chance de causar nos humanos a listeriose, que é uma zoonose, causando infecções que pode levar ao óbito. *L. monocytogenes* é encontrada no ambiente e no trato intestinal dos animais, o solo e os vegetais que estão em estado de decomposição são os locais que servem como reservatório para este patógeno, que pode infectar por meio da ingestão de alimentos contaminados (CATÃO e CEBALLOS, 2001; MANTILLA et al., 2007).

Essa bactéria tem seu crescimento em uma ampla faixa de temperatura, entretanto a faixa de temperatura ideal para seu crescimento é entre 30°C a 37°C, possuem capacidade de suportar de formas repetidas o congelamento e o descongelamento e tolera pH na faixa de 5 a 9. (BARANCELLI et al., 2001; MANTILLA et al., 2007)

### 2.6.3 *Salmonella spp.*

*Salmonella spp.* é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonetes e sua locomoção se dá por meio de flagelos que estão por toda célula bacteriana. Sua temperatura ideal fica na faixa dos 37°C e o pH neutro em torno de 7. Quando esta bactéria invade, ela causa danos ao organismo na mucosa do intestino, causando diarreia e febre (DOMINGOS et al., 2015).

*Salmonella* é um gênero de bactérias que são agentes patogênicos relacionados a intoxicações alimentares, podendo afetar a saúde dos humanos e de animais. A salmonelose é uma patologia que pode ser transmitida por meio da alimentação, animais infectados e por contato com pessoas hospitalizadas (SHINOHARA et al., 2008).

#### 2.6.4 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, classificada na forma de coco, sendo similar a formação de cachos de uvas, não possui mobilidade, sendo encontrada em animais de sangue quente, encontrada na pele, nos pelos e na narina (BRASIL, 2009).

*S.aureus* pode se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura, ficando entre 7 a 48,5°C, entretanto sua temperatura ótima para crescimento é 30 a 37°C, seu pH ótimo é neutro, na faixa do 7 a 7,5, essas condições favorecem que essa espécie tenha proliferação em diversos alimentos, sendo assim uma espécie que possui relevância para saúde pública, além de liberarem enterotoxinas, essas toxinas são resistentes aos processos industriais, como a pasteurização do leite (BRASIL, 2009; BRASIL, 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil proteico das proteínas do soro do leite de cabra, avaliar a atividade antimicrobiana e produzir peptídeos bioativos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar a separação das proteínas do leite de cabra por meio de precipitação isoelétrica;
- Identificar principais proteínas do soro do leite de cabra por SDS-PAGE;
- Realizar hidrólise enzimática das proteínas do leite de cabra, com Pepsina;
- Identificar os peptídeos presentes nos hidrolisados do soro do leite de cabra por eletroforese SDS-PAGE Tricina;
- Avaliar as propriedades antimicrobianas das proteínas do soro contra as linhagens de bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus*.

## 4. METODOLOGIA

As atividades foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Genética e Radiobiologia (BioGeR), no Departamento de Biologia Molecular (DBM), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Campus I.

### 4.1 Obtenção e preparação do leite caprino

As amostras de leite foram obtidas de um rebanho homogêneo de cabras, da raça alpina de peso com cerca de  $40 \pm 6$  kg, alimentadas com ração e com  $120 \pm 5$  dias de lactação, do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, que fica localizado no município de Bananeiras / PB. As amostras coletadas foram filtradas, desnatadas e, em seguida, armazenadas a  $-4$  °C até o início das análises subsequentes.

**Figura 1** - *Capra hircus* da raça Alpina



Fonte: Embrapa, 2012

#### 4.2 Obtenção do soro do leite

As proteínas do leite caprino foram fracionadas por meio de precipitação isoelétrica, mediante a adição de HCl 1 M até atingirem o pH 4,1 (EGITO et al., 2006; CEBALLOS et al., 2009). A amostra foi deixada em repouso, foi centrifugada para separação do soro da fração caseínica. O precipitado equivaleu às caseínas e o sobrenadante ao soro. O soro obtido foi dialisado contra água em membrana de 500 Da, congelado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , liofilizado ( $-80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e armazenado a  $18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3 Determinação do teor de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis presentes no soro do leite de cabra foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). A concentração de proteína foi avaliada utilizando a BSA como padrão. O ensaio consiste em adicionar 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,15 M em tubos de ensaio, adicionado 100  $\mu\text{L}$  de amostra, realizando diluição seriado e acrescentado 2,5 mL do reagente de Bradford, a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento onda de 595 nm.

#### 4.4 Hidrólise enzimática *in vitro* do soro do leite caprino

O soro do leite foi submetido a hidrólise enzimática *in vitro*, segundo a metodologia de Ahmed et al. (2015), com algumas alterações. A amostra de soro caprino teve o pH ajustado para os pH 1,5; 2,0; 2,5, e foram incubadas com a enzima pepsina por 90 min, 120 min e 150 min. Ao final desse tempo a reação foi interrompida por aquecimento 5 min/ $100^{\circ}\text{C}$  seguida de centrifugação por 5 min/ 5.000 rpm. O soro do leite hidrolisado foi dialisado em membranas de celulose com porosidade de 1 kDa contra água destilada até chegarem no pH neutro (7,0), congelado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , liofilizado ( $-80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e armazenado a  $18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 1** - Tempo e pH usados para a hidrólise com pepsina

<b>Tratamento</b>	<b>Enzima</b>	<b>pH</b>	<b>Tempo da reação (min)</b>
1	Pepsina	1,5	90
2	Pepsina	2,5	90
3	Pepsina	1,5	150
4	Pepsina	2,5	150
5	Pepsina	2,0	120

Fonte: O autor.

O grau de hidrólise dos experimentos foi realizado pelo método de OPA-ortophtaldideído, segundo a metodologia descrita por Spellman, (2003) e Silvestre, (2007). Amostras de 1 mg foram solubilizadas em 1 mL de água. Em placas do tipo Elisa foram adicionados 50 uL de amostra e 300µL do reagente OPA (metanol, β-mercatoeptanol, SDS a 20%, tetraborato de sódio 10mM). Os ensaios foram realizados em triplicatas, deixadas em repouso durante 2 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340nm.

#### 4.5 Identificação das proteínas solúveis e dos peptídeos nos hidrolisados do soro do leite

O perfil proteico do soro foi identificado em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (LAEMMLI, 1970).

A análise consiste em dois géis, onde o gel de aplicação será preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação será preparado na concentração de 12% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8 e SDS a 1%.

Os peptídeos obtidos por hidrólise enzimática foram analisadas em gel de SDS-PAGE Tricina, segundo a metodologia de Schägger; Von Jagow (1987), na qual é utilizado um gel de três fases: empilhamento (2 cm; 4% T; 3% C), espaçador (1 cm;

10% T; 3% C), e separação (5,5 cm; 16,5% T; 3%).

#### 4.6 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do soro do leite foi testada segundo as normas do protocolo M7-A6 do National Committee For Clinical Laboratory Standards – NCCLS (2015). A atividade antibacteriana do soro foi testada frente às cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estes microrganismos representam os principais agentes patogênicos e/ou deteriorantes que afetam os produtos lácteos e outros tipos de alimentos.

O bloqueio do crescimento bacteriano foi avaliado determinando-se a concentração de substância que reduz o crescimento quando comparado com o controle. Foi utilizado 3 mgP/ mL, o soro foi diluído em água destilada. As diluições seriadas foram em triplicatas e testadas em culturas bacterianas que tiveram seu crescimento em meio de cultura adequado. As culturas foram incubadas durante 24 horas, possuindo 24 leituras, uma leitura a cada hora e o desenvolvimento foi verificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm.

Para calcular a CIM- Concentração Inibitória Mínima foi utilizado os dados da menor concentração de amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para obtenção do percentual de inibição da amostra para cada espécie de bactéria foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$100 - \frac{\text{Absorbância(amostra + bactéria)}}{\text{Absorbância(controle)}} \times 100$$

#### 4.7 Análise estatística

Os ensaios da hidrólise enzimática e a atividade antibacteriana foram realizados em triplicatas e para a análise foi utilizado o software *Graphpad Prisma version 6* por meio da aplicação da Análise de variância - ANOVA utilizando o teste Dunnet. Sendo considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

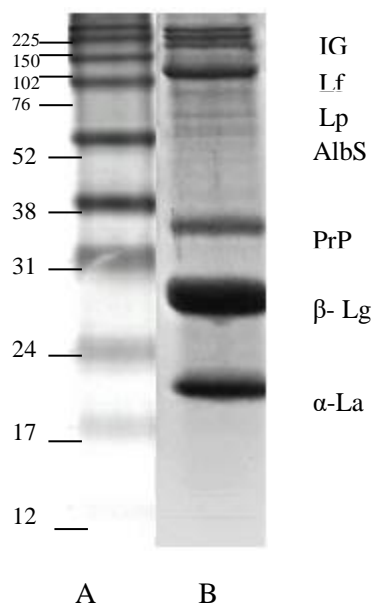
### 5.1 Teor proteico do soro do leite caprino

O teor proteico foi verificado pelo método de Bradford (1976), onde foi obtido um percentual de 64 % de proteínas solúveis no soro do leite caprino que correspondente a 0,64 mgP/mL. Este teor indica que o soro de leite caprino apresenta um alto percentual proteico que está sendo descartado, em vez de ser aproveitado pela indústria alimentícia como suplemento alimentar, bebidas lácteas entre outros, evitando assim o desperdício e muitas vezes a contaminação, devido ao descarte inadequado. A solubilidade das proteínas confere as suas aplicações, por exemplo, proteínas com baixa solubilidade são utilizadas na fabricação de alimentos (MACEDO, 2010).

### 5.2 Identificação do perfil das proteínas do soro do leite de cabra por SDS-PAGE

A SDS-PAGE, mostra o perfil das principais proteínas presentes no soro do leite caprino. Na figura 2 podemos identificar no soro do leite caprino as proteínas  $\alpha$ -lactalbumina com ~20kDa,  $\beta$ -lactoglobulina com aproximadamente ~28kDa, proteose-peptona na faixa dos 36 kDa, lactoferrina ~150 kDa e Imunoglobulina com massa de ~225 kDa, quando comparado a dados da literatura. O perfil das proteínas presentes no soro do leite caprino possui similaridade quando comparado ao perfil proteico do leite bovino (HARAGUCHI et al., 2006).

**Figura 2-** Perfil proteico do soro do leite de cabra em SDS-PAGE.



(A) marcadores de peso molecular (kDa), (B) proteínas do soro do leite de cabra, IG (imunoglobulina), LF (lactoferrina), LP (lactoperoxidase), AlbS (albumina sérica), proteose-peptona (PrP),  $\beta$ -Lg (Beta lactoglobulina) e  $\alpha$ -La (alfa lactalbumina).

### 5.3 Peptídeos do soro do leite caprino obtidos por hidrólise enzimática

Os peptídeos obtidos a partir da hidrólise do soro do leite caprino foram analisados nos tempos de 90, 120 e 150 min, sendo o tempo de 120 min o tempo ótimo da enzima. Para efeito de análise comparamos os resultados do tempo 90 e 150 minutos, entre si e com o tempo ótimo da enzima que corresponde ao 120 min.

Os dados obtidos através das análises da hidrólise com pepsina mostram que o fator tempo 150 min foi o melhor parâmetro para a hidrólise quando comparado os valores de tempo de 90 e 150 min, pois verificamos um percentual de hidrólise próximo ao do ponto central que corresponde a 120 min (tabela 2). Pelos resultados obtidos o fator pH nos tempos 90 e 150 min não tiveram influencia sobre a hidrólise. Porém os dois tempos testados apresentaram grau de hidrólise superior a 20%, significando provável atividade biológica.

Segundo Agyeietet al., (2016) os hidrolisados com baixo grau de hidrólise, ou seja, inferior a 10%, produzem peptídeos com capacidade de formar espumas e emulsificantes, enquanto que os hidrolisados com valores maiores de grau de hidrólise,

sendo assim com valor superior a 10% podem produzir peptídeos com atividades biológicas. Como são mostrados na tabela 2, os hidrolisados obtidos possuem o grau de hidrólise superior a 10%, sendo assim, ocorreu à produção de peptídeos que podem exercer diferentes funções biológicas.

**Tabela 2** - Valores referentes do grau de hidrólise, pelo método de OPA

Hidrolisados	Tipo de enzima	pH	Tempo da reação (min)	Grau de Hidrólise % (OPA)
1	Pepsina	1,5	90	25,34
2	Pepsina	2,5	90	26,60
3	Pepsina	1,5	150	30,06
4	Pepsina	2,5	150	30,50
5	Pepsina	2,0	120	35,55

#### 5.4 Identificação dos peptídeos do soro do leite de cabra

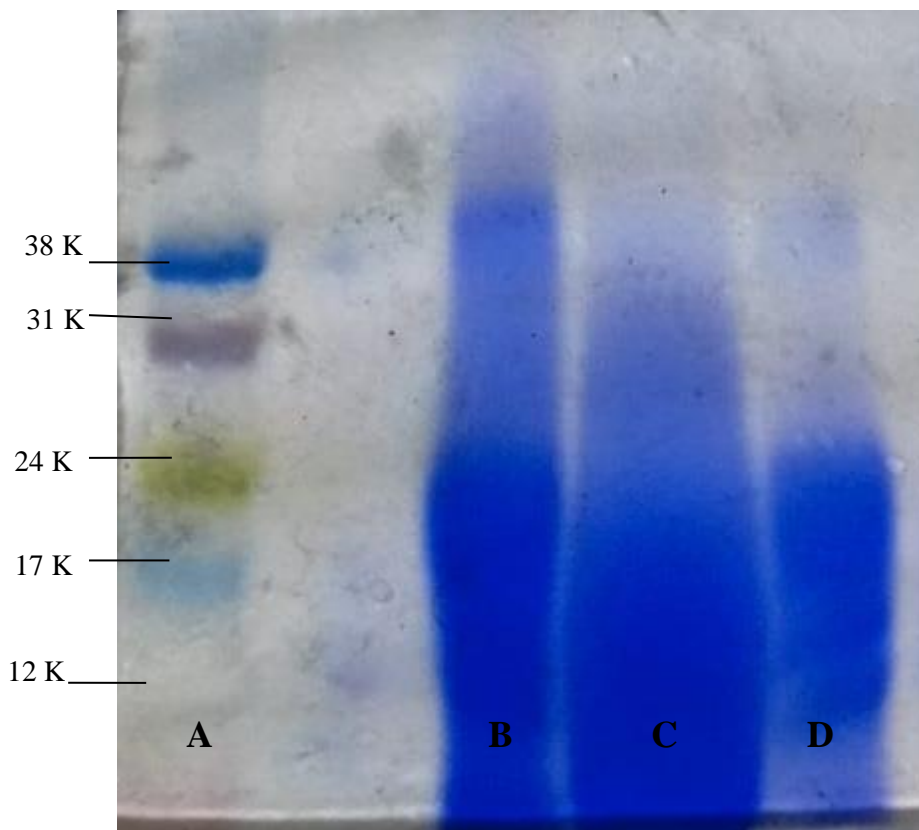
A identificação do perfil peptídico foi realizado por SDS-PAGE Tricina onde pode-se verificar que a hidrólise proteica foi eficaz. Os perfis peptídicos foram analisados nos tempos de 150 min pH 1,5 e 2,5 e 120 min pH 2,0 que correspondem ao melhor grau de hidrólise e ponto central que é o valor referencia para a pepsina respectivamente.

Nota-se que o tempo e o pH de reação influenciaram na hidrólise dos peptídeos. Os fragmentos de proteínas com maior peso molecular se encontra no hidrolisado de pH 1,5 no tempo de 150 minutos, portanto podemos observar um menor grau de hidrólise quando comparados ao tempo ótimo e com pH 2,5 no tempo de 150 min (figura 3). No tempo de 120 min e pH 2,0 que correspondem ao ótimo da enzima tivemos uma hidrólise superior aos demais, como podemos verificar na tabela 2 e no perfil peptídico.

A análise dos dados da SDS-PAGE -Tricina no tempo de 150 min e pH 2,5 apresentou um perfil peptídico semelhante ao ótimo da enzima, apesar de os resultados do OPA serem divergentes. Os dados obtidos pelo método de OPA que gera os percentuais de hidrólise podem ter pequenas variações devido a ser um método colorimétrico, também pelo fato de poder ocorrer a insolubilização de alguns peptídeos

que contenham em sua sequência aminoácidos hidrofóbicos e este método somente é válido para peptídeos e proteínas solúveis.

**Figura 3** – Análise dos hidrolisados do soro do leite caprino.



(A) marcadores de peso molecular (B) Hidrolisado no pH 1,5 e 150 min, (C) Hidrolisado no pH 2,0 e 120 min, (D) Hidrolisado no pH 2,5 e 150 min.

### 5.5 Atividade antibacteriana

Os ensaios da atividade do soro do leite de cabra na inibição do crescimento bacteriano, mostrou ação inibitória frente às cepas de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* ATCC 912415D. Entretanto a inibição possui o percentual diferente para cada organismo, como é mostrado na Tabela 3. Os dados nos mostram que *Staphylococcus aureus* ATCC 912415D foi inibido em mais de 30% com 15µg de proteínas do soro do leite caprino. Este resultado comprova dados de literatura que as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a inibição devida sua estrutura de membrana.

Podemos observar que as concentrações utilizadas para inibir o crescimento das

bactérias Gram-negativas *E. coli* foi similar a *Listeria monocytogenes* com maior atividade para *L. monocytogenes* bactéria Gram-positiva. A inibição mostra que proteínas de soro de leite caprino potencial biotecnológico contras bactérias, especialmente as Gram-positivas.

**Tabela 3** - Concentração Inibitória Mínima - CIM e % de inibição do soro do leite de cabra

Bactéria	CIM	% de inibição
<i>Salmonella spp.</i> (-)	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	23,30
<i>Escherichia coli</i> (-)	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	25,61
<i>Listeria monocytogenes</i> (+)	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	39,00
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32,02

As cepas de bactérias *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* ATCC 912415D foram inibidas pelo soro do leite caprino na concentração de 3 mg do soro diluído em 1 mL de água, que corresponde ao valor aproximado de 1.9 mg/mL de proteínas solúveis, comprovado pelo método de Bradford. O crescimento bacteriano foi inibido após 8 horas de incubação, como pode ser observado nos gráficos 1 e 4. Para as cepas de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* a inibição ocorreu após 10 horas de incubação gráficos 2 e 3.

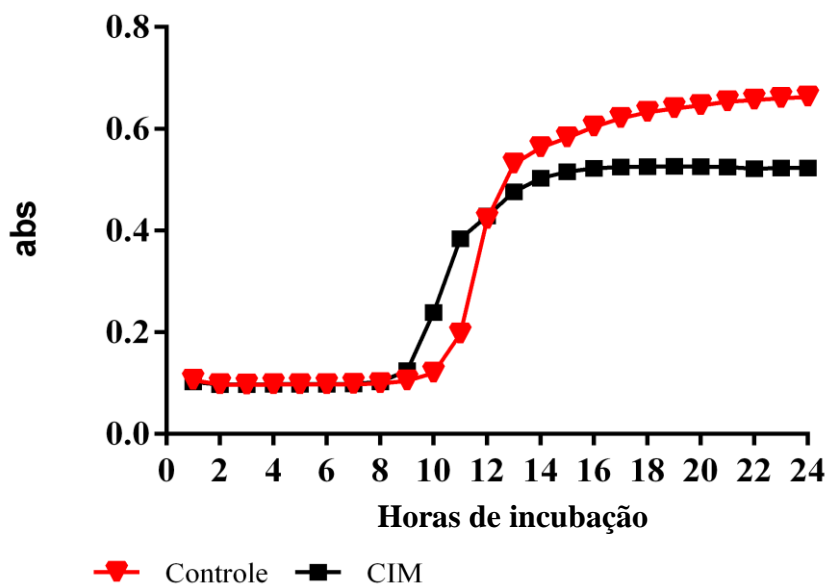
Comparando cada atividade antibacteriana, o soro caprino possui maior percentual inibitório frente às cepas de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* com mais de 30% de inibição. Quando avaliado frente às cepas de *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*, apresenta valor superior de 20 % de inibição.

As propriedades bacterianas das proteínas do soro do leite são relatadas por Sgarbier (2004) que observou que a lactoferrina possui atividade biológica, atuando na

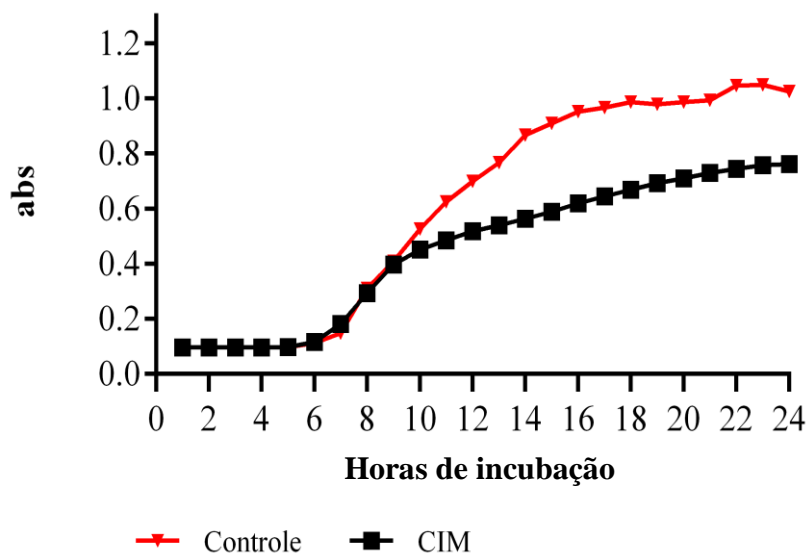
inibição da proliferação e crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Segundo Atanasova e Ivaniva (2014) a atividade antibacteriana é atribuída às Imunoglobulinas e as proteínas lactoferrina e lactoperoxidase. Na análise percebe-se que o soro possui maior atividade de inibição em bactérias Gram-positivas, porém há inibição em Gram-negativas, a lactoferrina pode inibir o crescimento bacteriano devido à ligação do íon ferro ou por danificar a membrana externa dessas bactérias, esse dano é causado por ligações nos lipopolissacarídeos, no qual este carboidrato é um dos componentes na parede celular de bactérias gram-negativas (MADUREIRA, 2007).

Segundo Haraguchi (2006) a alfa-lactalbumina também possui atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, uma delas é a *Escherichia coli*. Os ensaios de Šarić et al. (2012) mostrou que o leite de jumenta possui potencial antibacteriano contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, sendo a maior inibição em *Listeria monocytogenes*.

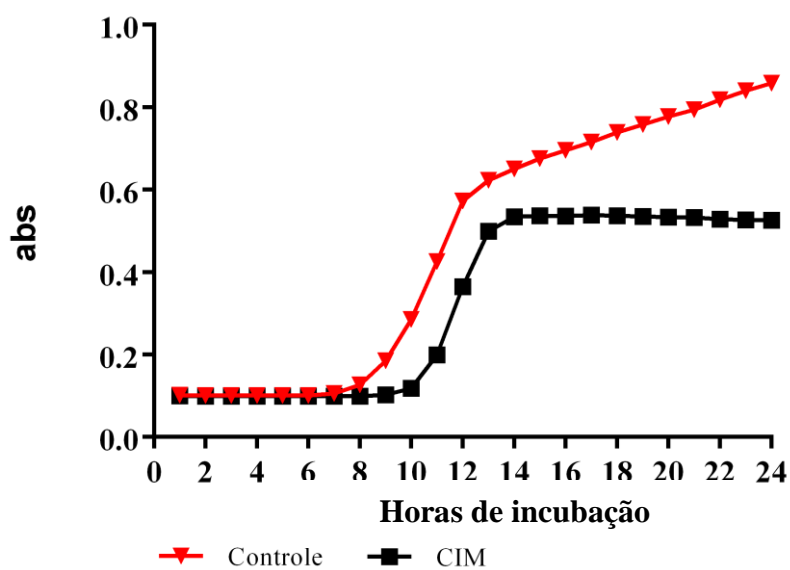
**Gráfico1-**Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado (3 mgP/mL) por 24 h frente as cepas de *Salmonella spp.*



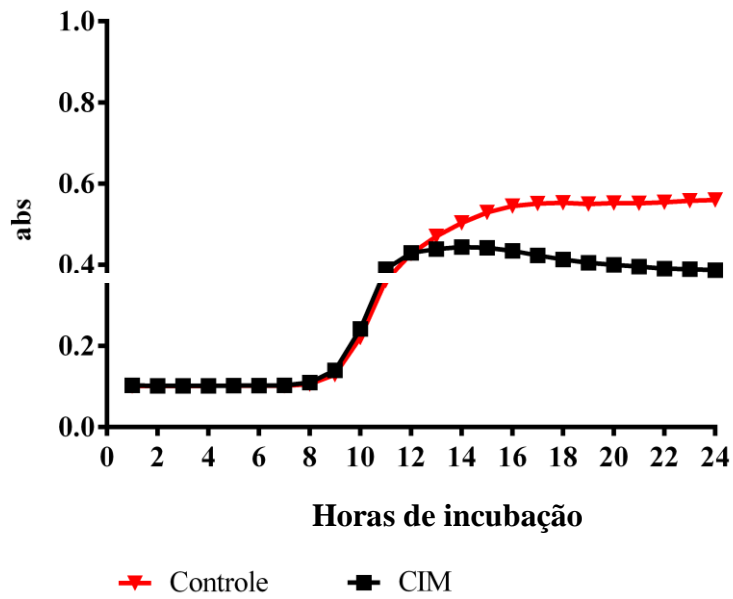
**Gráfico 2-** Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado (3 mgP/mL) por 24 h frente as cepas de *Escherichia coli* HSL1.



**Gráfico 3 -** Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado (3 mgP/mL) por 24 h frente as cepas de *Listeria monocytogenes*.



**Gráfico 4-**Atividade antibacteriana do soro do leite de cabra concentrado (3 mgP/mL) por 24 h frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 912415D.



## **6. CONCLUSÃO**

O soro do leite caprino possui alto teor de proteínas solúveis com atividade antimicrobiana, frente às cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse alimentar e patogênicas. Além disso, a hidrólise enzimática gerou potenciais peptídeos bioativos, Devido a suas propriedades as proteínas do soro do leite de cabras podem ser utilizadas para o uso industrial, alimentícia e como possível produto farmacêutico.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, M.P.; MOREIRA, R.O.; JÚNIOR, P.H.R.; MARTINS, M.C.F.; PERRONE, I.T. Soro do leite: Tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226. 2014.

AGYEI, D.; ONGKUDON, C.M.; WEI, C.Y.; CHAN, A.S.; DANQUAH, M.K., D. Bioprocess Challenges to the Isolation and Purification of Bioactive Peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 244-256. 2016.

ARAÚJO, F.N. Avaliação do Perfil Protéico e Atividade Biológica do Soro do Colostro Caprino. 2017. Dissertação (mestrado). Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa.

ATANASOVA, J; IVANOVA, I. Antibacterial Peptides from Goat and Sheep Milk Proteins. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, p. 1800-1803, 2014.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes* ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, n.1, p.155-168, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. A review. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161. 2015.

BRASIL. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE. **Manual de caprinocultura**. Recife – Pe, 2000.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. **Produção de Leite de Cabra em Comunidades de Base Familiar**, 2005.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. **Cultura, Crescimento e Identificação de Bactérias do Gênero *Staphylococcus aureus* em Leite de Cabra**, 2009.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. **Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha**, 2010.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. **Características físico-químicas e produtivas do leite de cabras de raças naturalizadas do Semiárido pernambucano**, 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Pecuária Municipal 2016: Centro-Oeste concentra 34,4% do rebanho bovino do país**. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/16992-pecuaria-municipal-2016-centro-oeste-concentra-34-4-do-rebanho-bovino-do-pais>>. Acessado em 07 de julho de 2018.

CAMPOS, M.R.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.P.B.; VIEIRA, C.A.S.; JAYME, L.B.; SANTOS, P.P; SERAFINI, A.B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p. 1221–1227, 2006.

CATÃO, R.M.R.; ABREU, W. C.; CELLABOS, B.S.O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n.3, p. 281-287, 2001.

DOMINGOS, I.; BRUNELLI, S.R.; BALDOTTO, S.B. ***Salmonella spp.* – UMA REVISÃO**. Disponível em: <[http://fait.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/q399yynEtu5Lpbn\\_2015-2-3-15-43-4.pdf](http://fait.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/q399yynEtu5Lpbn_2015-2-3-15-43-4.pdf)>. Acessado em: 25 de outubro de 2018.

EGITO, A. S; ROSINHA, G. M. S; LAGUNA, L. E. ; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; Gaillard, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite

caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acessado em: 08 de julho de 2018.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 19, n.4, p. 479-488, 2006.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J. Á. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 196–204, 2011.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G, Bonomi F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **Eur. J. Biochem**, 237:106-12, 1996.

KRISSANSEN, G. W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 713– 723, 2007.

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

KRÜGER, C.C.H. Produção e caracterização química e fisiológica de caseinofosfopeptídeo de leite bovino. 2006. 149p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MACEDO, A.. Fracionamento de lactosoro de ovelha por tecnologias de membranas e estudos das possíveis utilizações dos concentrados obtidos. 450 páginas. Tese de

Doutorado - Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Portugal, 2010.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.P.; PINTADO M.E., MALCATA F.X. Bovine whey proteins: overview on the main biological properties. **Food Research International**. 2007;40:1197-211.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X.; Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 437–455, 2010.

MADUREIRA, K. M.; GOMES, V.; ARAÚJO, W. P. Physicochemical and cellular characteristics of milk from Saanen, Alpine and Toggenburg goats. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 39-43, 2017.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, E.B.S.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v.14, n.1, p. 180-192. 2007.

NATIONAL COMITE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 10th ed, Wayne, Pennsylvania. NCCLS document M7 – A6, 2015. 15 p.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, n. 1, v. 2, p. 368-79, 1987.

SGARBIER, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 394-409, 2004.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILHO, J.L.L. *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

ŠARIĆ, L; ŠARIĆ, B.M; MANDIĆ A.I; TORBICA, A.M; TOMIĆ, J.M; CVETKOVIĆ, D.D; OKANOVIĆ, D.G. Antibacterial properties of domestic Balkan donkeys' milk. **IntDairy J** 25:142–146, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI R. D; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. Review Article. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 756–774, 2015.