

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

ANÁLISE PROTEÔMICA E POTENCIALIDADES DE
PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DA FRAÇÃO CASEÍNICA DE LEITE
CAPRINO

JOÃO PESSOA

2019

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

ANÁLISE PROTEÔMICA E POTENCIALIDADES DE
PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DA FRAÇÃO CASEÍNICA DE LEITE
CAPRINO

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B238a Barbosa, Paula Perazzo de Souza.

Análise proteômica e potencialidades de proteínas e peptídeos da fração caseínica de leite caprino / Paula Perazzo de Souza Barbosa. - João Pessoa, 2019.
107 f.

Orientação: Tatiane Santi Gadelha.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Leite caprino. 2. Proteínas lácteas. 3. Hidrólise enzimática. 4. Potencial biológico. I. Santi Gadelha, Tatiane. II. Título.

UFPB/BC

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

ANÁLISE PROTEÔMICA E POTENCIALIDADES DE
PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DA FRAÇÃO CASEÍNICA DE LEITE
CAPRINO

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento aos requisitos para
obtenção do título de Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Tatiane Santi Gadelha

JOÃO PESSOA
2019

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

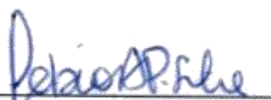
ANÁLISE PROTEÔMICA E POTENCIALIDADES DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DA
FRAÇÃO CASEÍNICA DE LEITE CAPRINO

Tese de doutorado aprovada em 28/03/2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Tatiane Santi Gadelha – DBM/UFPB
Orientadora



Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva – DEAL/CT/UFPB
Examinador interno



Prof. Dra. Ângela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro – CTDR/UFPB
Examinadora Interna

Prof. Dra. Helliada Vasconcelos Chaves – UFC
Examinadora externa

Prof. Dra. Mônica Tejo Cavalcanti – CCTA/UFCG
Examinadora externa

RESUMO

O leite caprino é uma importante matriz alimentar rica em proteínas que pode apresentar propriedades funcionais importantes, tanto na área nutricional quanto farmacêutica. Este estudo teve como objetivo caracterizar as proteínas presentes na fração caseínica (FCN) do leite caprino, obter peptídeos bioativos da FCN através da hidrólise *in vitro* com enzimas pepsina e tripsina; e testar o potencial biológico da FCN e dos seus peptídeos. Para tanto, o leite caprino foi coletado em três períodos distintos pós-parto: 4 ± 2 dias (colostro); 28 ± 2 (pico de lactação); e 120 ± 2 (leite maduro). Em seguida, desnatado por centrifugação e submetido à precipitação isoelétrica mediante adição de ácido clorídrico até atingir o pH 4,1. O precipitado, correspondente à FCN, foi lavado com água destilada, solubilizado com hidróxido de sódio para determinar as proteínas solúveis pelo método de Bradford, dialisado em membrana de celulose (*cut-off* 14 kDa), congelado e liofilizado. Foi feita a caracterização química parcial e SDS-PAGE das FCNs que, posteriormente, foram submetidas à técnica nLC-ESI-MS/MS. A FCN do leite coletado de cabras com 28 ± 2 dias de lactação foi hidrolisada com pepsina seguida de tripsina. A FCN do leite maduro foi caracterizada por meio de eletroforese bidimensional, quanto ao perfil aminoacídico e quanto à atividade antinociceptiva. Posteriormente, foi hidrolisada com pepsina e tripsina, separadamente. O perfil peptídico foi identificado por eletroforese Tris-Tricina. Os hidrolisados tiveram seu potencial biológico avaliado por meio de atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp e *Pseudomonas aeruginosa*; e antioxidante através dos métodos de ABTS, DPPH e FRAP. Os resultados deste estudo mostram que a fração caseínica de leite caprino é rica em proteínas, e sofre alterações no perfil proteico ao longo da lactação, de acordo com a necessidade nutricional do filhote, sendo que algumas proteínas encontradas, principalmente na fração do leite maduro, podem expor novas abordagens biotecnológicas como potencial anticancerígeno. A FCN do leite maduro apresenta atividade antinociceptiva, e aminoácidos essenciais e não essenciais, tendo com alto teor de ácido de glutâmico, seguido de prolina. Tanto o hidrolisado das proteínas presentes na FCN do leite coletado de cabras com 28 ± 2 dias de lactação quanto os da FCN do leite maduro possuem peptídeos com propriedades antimicrobianas. Os hidrolisados da FCN do leite maduro também apresentam propriedades antioxidantes. Assim, as proteínas da FCN do leite caprino são uma oportunidade interessante para aplicação como agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais que podem ser usados para fins terapêuticos.

Palavras-chaves: Leite caprino, proteínas lácteas, hidrólise enzimática, potencial biológico.

ABSTRACT

Goat milk is an important protein-rich food matrix that may present important functional properties in both nutritional and pharmaceutical areas. The objective of this study was to characterize the proteins present in the casein fraction (FCN) of goat milk, to obtain bioactive peptides from the FCN through in vitro hydrolysis with enzymes pepsin and trypsin; and to test the biological potential of the FCN and its peptides. For this, goat milk was collected in three distinct postpartum periods: 4 ± 2 days (colostrum); 28 ± 2 (peak lactation); and 120 ± 2 (mature milk). Then, it was skimmed by centrifugation and subjected to isoelectric precipitation by addition of hydrochloric acid to pH 4.1. The precipitate, corresponding to the FCN, was washed with distilled water, solubilized with sodium hydroxide to determine the proteins soluble by the Bradford method, dialysed against in cellulose membrane (cut-off 14 kDa), frozen and lyophilized. Partial chemical characterization composition and SDS-PAGE of the FCNs were made, which were subsequently submitted to the nLC-ESI-MS/MS technique. The FCN of milk collected from goats with 28 ± 2 days of lactation was hydrolyzed with pepsin followed by trypsin. The FCN of mature milk was characterized by means of two-dimensional electrophoresis, regarding the amino acid profile and antinociceptive activity. Subsequently, it was hydrolyzed with pepsin and trypsin, separately. The peptide profile was identified by Tris-Tricine electrophoresis. The hydrolysates had their biological potential evaluated by means of antibacterial activity for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp and *Pseudomonas aeruginosa*; and antioxidant by the ABTS, DPPH and FRAP methods. The results of this study show that the casein fraction of goat milk is rich in proteins and changes its protein profile during lactation according to the nutritional needs of the puppy. Some proteins found, mainly in the mature milk fraction, can expose new biotechnological approaches as anticancer potential. The FCN of mature milk shows antinociceptive activity, and essential and non-essential amino acids, with high content of glutamic acid, followed by proline. Both the hydrolyzate of the proteins present in the FCN of the milk collected from goats with 28 ± 2 days of lactation and those of the FCN of the mature milk have peptides with antimicrobial properties. FCN hydrolysates of mature milk also have antioxidant properties. Thus the goat milk proteins are an interesting opportunity for application as antimicrobial agents and natural antioxidants that can be used for therapeutic purposes.

Key words: Goat milk, milk proteins, enzymatic hydrolysis, biological potential.

DEDICATÓRIA

Ao nosso Deus, por nos conceder o dom da Vida.
Aos meus pais, Adriano e Elizabeth; e à minha irmã Marilda.

Dedico!

“O heroísmo não consiste em não ter medo, mas em superá-lo”

(Roberto Gómez Bolaños)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao nosso poderoso Deus, pela oportunidade de ter vivido essa fase e de conquistar essa vitória tão importante na minha vida, tanto escolar como pessoal.

À minha orientadora, a professora Dra. Tatiane Santi Gadelha, pela confiança, apoio e dedicação depositados novamente em mim durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais, Adriano Perazzo Barbosa e Maria Elizabeth de Souza Barbosa, por me ajudarem e confiarem em mim nessa caminhada tão importante. Amo vocês.

Aos meus tios, Normando Perazzo Barbosa e Yolanda Wanderley, por toda a assistência e incentivo durante o meu período de curso; Aos primos Stefano, Marta e seu filhinho Luca, pelos bons momentos durante a minha estadia aqui.

À minha avó paterna, Sílvia Perazzo Barbosa, que sempre me estimulou a seguir em frente com os estudos.

Aos meus tios/padrinhos Alessandra Perazzo Barbosa e Francisco Ocian Mota, pelas conversas e sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do meu projeto de tese.

À Universidade Federal da Paraíba, pela oferta do curso e pela oportunidade de avançar na minha formação acadêmica.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) durante o meu período de curso.

Às secretárias do PPGCTA, Lindalva Nóbrega e Fernanda Feitosa, por toda a atenção concedida sempre que solicitadas.

Aos meus professores nas disciplinas no PPGCTA, que muito contribuíram na minha formação acadêmica: Ângela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro, Antônia Lúcia de Sousa, Carolina Leal, Flávio Luiz Honorato, Haíssa Roberta Cardarelli, Juliana Késsia Barbosa Soares, Marciane Magnani, Marta Suely Madruga, Marta Maria da Conceição, Maria Elieyde Gomes de Oliveira, Ricardo Targino Moreira, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga.

Ao então chefe do setor de Caprinocultura do câmpus de Bananeiras, o professor Dr. George Beltrão, por autorizar o fornecimento do leite que utilizei no trabalho.

A Fabiano Tavares de Moura, colega de turma, que me ajudou a contatar o professor Dr. George Beltrão; à Michele, técnica do setor de caprinocultura, e a Gerson Inácio, que me ajudaram com muitas informações relevantes para este trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha, por me ceder espaço no Laboratório de Proteômica (LaProte), do qual é coordenador, bem como por toda a atenção concedida sempre que solicitado, em especial, durante as análises de eletroforese.

À professora Hellíada Vasconcelos Chaves e sua equipe da UFC, câmpus de Sobral, pela atividade antinociceptiva *in vivo*.

À professora Teresa Pacheco, pela análise de aminoácidos totais.

Ao professor Luciano Pinto, pela análise de eletroforese bidimensional.

À colega Sinara Fragoso, pela análise de composição centesimal.

À professora Ângela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro e à aluna Maristela, pela atividade antioxidante.

Ao José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda, juntamente com o pessoal da USP e da UNIFESP, pela análise de espectrometria de massas.

Aos professores do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Augusto e Davi, sempre prontos para sanar dúvidas.

Aos funcionários do DBM, seu Bosco, Cesar, Dione, Geralda. Seu Moreira e Regina Emy, por serem atenciosos sempre que requisitados.

Aos professores que aceitaram compor a Banca Avaliadora do meu trabalho, tanto no exame de qualificação como no exame final: Ângela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro, Daniela Priscila Marchi Salvador, Hellíada Vasconcelos, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, Fábio Anderson, Mônica Tejo Cavalcanti.

Aos alunos das turmas de mestrado e de doutorado de 2015 e 2016, com os quais tive a oportunidade de conviver ao cursar as disciplinas do Programa.

A todos os estudantes que fizeram parte do BioGer-Lab e do LaProte durante o meu período de pesquisa: Annie Evelyn, Maria Isabel (Bel), Emília Carmem, Carlos Maia, Cícero, David Kleberson, Francielly Negreiros, Francisco Diassis, Giúlian César Sá, Isabella Araújo, Joanderson Pereira, João Paulo, Joice Nascimento, José Roberto, Júlia Caju, Kamilla Bezerra, Karol Lima, Maria Eugênia, Matheus Augustus, Milla Sousa, Namíbia Kelly, Nathália Regina Galvão, Neusa Lígia, Raquel, Samantha de Lima, Samara Batista, Thaís Santos, Valgrícia.

Ao senhor Benedito Elmiro (seu Bené), técnico do BioGer-Lab, sempre muito disposto a nos ajudar. Obrigada pelas muitas risadas proporcionadas.

Ao Daniel Piancó e sua esposa, amigas desde os tempos de mestrado.

À Edilza Nascimento, que me proporcionou muitos momentos de conversas e reflexão durante instantes críticos.

À Francielly Negreiros, pela bela amizade, ensinamentos e pelas muitas conversas sobre livros.

Ao (Dr.) Joanderson, pela amizade, dicas, sugestões, risadas e “cursos” ao longo do trabalho.

Ao Joellington Almeida, a quem conheci nos últimos meses de curso, mas que me deu uma amizade preciosa.

Ao Juarez Nóbrega, bela amizade que conquistei desde os tempos de mestrado.

À Kaline e Michele, cujo contato foi muito rápido durante o curso das disciplinas, mas que me proporcionaram uma amizade grandiosa.

À Karol Lima, pela amizade e conversas em momentos difíceis.

À Maria Emília e Esther Pereira, duas grandes amigas dos tempos de mestrado que guerrearam muito para me ajudar em determinadas situações.

À Maria Eugênia e Raquel, pelas conversas, saídas, filmes, paciência na livraria e também pelos *fast-foods* saudáveis.

À Maria Isabella Araújo pelas conversas em momentos custosos, saídas e *fast-foods* saudáveis. Foi gratificante te conhecer!

À Marília Santos, outro grande presente que o doutorado me deu. Foi muito bom te conhecer.

À Samantha Lima, cuja aproximação maior se deu já no final do curso. Obrigada pelas conversas, pela amizade.

À Thaís Susana, aluna de iniciação científica que me ajudou na execução de parte do trabalho aqui exposto.

Aos serumaninhos Aleson Pereira, Edilza Nascimento, Karla Kalígia e Liliane Andrade, pelas conversas, risadas, etc. Enfim, pelos grandes momentos de distração e descontração.

À Liana Brito Lyra Marolla, grande amiga e profissional que muito contribuiu para o meu amadurecimento pessoal.

À minha vizinha Maria Iva, seu esposo e filhos. Muito obrigada pela amizade.

À minha professora Séfora Souto, que também teve participação significativa no meu processo de amadurecimento pessoal, e às minhas colegas Ana Laura, Andrea Lúcia, Kátia Dumont e Vilma Alcântara.

À Ada, Edilânia e Paulina que, mesmo distantes, ajudaram com palavras de força em momentos difíceis.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram de forma direta ou indireta para o andamento do meu trabalho e estiveram presentes nessa fase de minha vida.

Que Deus abençoe a todos sempre!!!
Paula Perazzo de Souza Barbosa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ANOVA: Análise de variância

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

BSA: Soro albumina sérica

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CID: *Collision-induced dissociation* (Dissociação induzida por colisão)

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato

DAB: 4-dimetilaminobenzaldeído

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DTT: Ditionitrito

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IPG: *Immobilized pH gel*

MS/MS: Espectrometria de massas em *tandem*

NCCLS: *National Comitê For Clinical Laboratory Standards*

nLC-ESI-MS/MS: Nano Cromatografia Líquida com Ionização por *Electrospray* e Espectrometria de Massas em *Tandem*

ppm: Partes por milhão

RSLC: *Rapid Separation Liquid Chromatography*

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TCA: Ácido tricloroacético

TEAC: *Trolox equivalent antioxidant capacity*

TEMED: N - N' - N'' - N''' - tetrametiletilnodiamina

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

TRIS: Tris (hidroximetil)-aminometano

UFC: Unidade formadora de colônia

WHO: *World Health Organization*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Cabras do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), câmpus III, Bananeiras / PB.....	17
Figura 2	Espécies que, provavelmente, deram origem à cabra doméstica (<i>C. hircus</i>).....	18
Figura 3	Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas com o leite caprino coletado em diferentes períodos de lactação.....	30
Figura 4	Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas com a fração caseínica do leite caprino coletado com 28 ± 2 dias pós-parto (pico de lactação).....	31
Figura 5	Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas com o leite caprino coletado com 120 ± 2 dias pós-parto (leite maduro).....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 OS CAPRINOS E A ESPÉCIE <i>Capra hircus</i>	17
2.2 A CAPRINOCULTURA NO BRASIL, NORDESTE E PARAÍBA.....	18
2.3 A RAÇA ALPINA.....	20
2.4 AS PROTEÍNAS DO LEITE.....	20
2.4.1 As proteínas da família das Caseínas.....	22
2.5 PEPTÍDEOS DO LEITE.....	23
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	25
2.6.1 Atividade antibacteriana.....	25
2.6.2 Atividade antinociceptiva na articulação têmporo-mandibular.....	26
2.6.3 Atividade antioxidante.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO.....	32
3.2 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE CAPRINO.....	32
3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DA FRAÇÃO CASEÍNICA.....	32
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR PROTEICO SOLÚVEL.....	32
3.5 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS	33
3.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO.....	33
3.6.1 SDS-PAGE.....	33
3.6.2 Eletroforese bidimensional.....	34
3.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DA FRAÇÃO CASEÍNICA DO LEITE CAPRINO.....	35
3.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE.....	35
3.9 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO	36
3.9.1 SDS-PAGE na presença de Tricina.....	36
3.10 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	37
3.11 PESQUISA NAS BASES DE DADOS.....	38
3.12 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	38
3.12.1 Atividade antibacteriana.....	38
3.12.2 Atividade antinociceptiva.....	39

3.12.2.1 Animais de experimentação.....	39
3.12.2.2 Injeção intra-articular de formalina.....	39
3.12.2.3 Teste comportamental para avaliação das respostas nociceptivas.....	40
3.12.2.4 Efeito da fração caseínica na hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos.....	40
3.13.4 Atividade antioxidante.....	41
3.13.4.1 Atividade antioxidante através da captura do radical 2,2-difenil-1picrilhidrazila (DPPH).....	41
3.13.4.2 Atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS.....	42
3.13.4.3 Capacidade de redução férrica.....	42
3.13.5 Análise estatística.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
4 RESULTADOS.....	57
4.1 ARTIGO 1: COMPARATIVE PROTEOMIC PROFILING OF GOAT MILK CASEIN FRACTIONS OVER LACTATION.....	58
4.2 ARTIGO 2: PROTEOMIC AND POTENTIALITIES OF PROTEINS AND PEPTIDES OF CASEÍNA FRACTION OF GOAT MILK.....	78
4.3 PATENTE 1: PRECIPITADO PROTEICO DE LEITE CAPRINO COMO AGENTE ANTINOCICEPTIVO E USO ANALGÉSICO.....	99
4.4 PATENTE 2: HIDROLISADO DA FRAÇÃO CASEÍNICA DE LEITE CAPRINO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO.....	99
4.5 PATENTE 3: OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DE FRAÇÃO CASEÍNICA E SEU USO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA INFECÇÕES PROVOCADAS POR <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp</i> E <i>Escherichia coli</i>	100
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
ANEXOS.....	102

1 INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro alimento ofertado aos filhotes de mamíferos ao nascerem e fornece todo o aporte energético e nutricional necessários ao seu crescimento e desenvolvimento, além de promover a saúde dos mesmos (KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014). Tanto o leite como os derivados, além de serem fontes de nutrientes, proporcionam meios de subsistência para agricultores, comerciantes e outros setores da cadeia produtiva (MUEHLHOFF; ANTHONY; DEIRDRE, 2013). Os estudos também indicam que tal matriz alimentar executa possíveis papéis no tratamento e prevenção de doenças crônicas como cardiovasculares, obesidade e diabetes, e alguns tipos de cânceres (PEREIRA, 2013).

As características composicionais do leite variam entre as diferentes espécies mamíferas e podem ser influenciadas por diversos fatores como raça, estágio de lactação, alimentação do animal, sistema de criação, genética, fisiologia e condições ambientais (GOFF, 2015). Entender essas alterações é crucial para compreender o processo de lactação e os diferentes aspectos da nutrição infantil (WU et al., 2016).

As proteínas lácteas podem exercer muitas funcionalidades *in vivo* por meio de peptídeos naturais, que são inativos quando dentro da sequência proteica original. Até então, substâncias bioativas de produtos como leite, queijo e ovos têm sido estudadas por serem fontes valiosas de peptídeos bioativos (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015).

Muitos estudos têm identificado e explorado peptídeos bioativos no leite de diferentes espécies de mamíferos, oriundos das caseínas e das proteínas do soro, seus dois principais grupos de proteínas. Os peptídeos podem ser liberados *in vivo*, no processo de digestão gastrointestinal, ou *in vitro*, por meio da fermentação do leite ou ação de enzimas proteolíticas (SALAMI et al., 2008) como a tripsina, pepsina e quimotripsina (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015).

Entre as atividades biológicas relacionadas para peptídeos derivados de proteínas lácteas verifica-se a antibacteriana (ESMAELPOUR et al., 2016), inibição da enzima conversora de angiotensina, antioxidante (ABDEL-HAMID et al., 2017), opiácea, imunomodulatória (ERIKSEN et al., 2008), antitrombótica, hipocolesterolêmica (YAMAUCHI; OHINATA; YOSHIKAWA, 2003) e anti-hipertensiva, as quais têm despertado grande interesse dos pesquisadores pelo potencial que desempenham (HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2014).

Peptídeos de lácteos apresentam grandes versatilidades fisiológicas e físico-químicas, características que podem colocá-los como constituintes promissores para incorporação em alimentos funcionais, suplementos dietéticos e formulações farmacêuticas direcionadas a

doenças específicas (PATIL et al., 2015). Ademais, o leite caprino, além de apresentar grande valor nutritivo, destaca-se por possuir propriedades fisiológicas, devendo ser promovido em países em desenvolvimento, já que o custo de manutenção dos animais é relativamente mais baixo.

Com relação ao leite caprino, alguns estudos têm sido realizados com as proteínas e peptídeos derivados, porém ainda são escassos, principalmente no que diz respeito ao leite de cabras criadas no semiárido brasileiro.

No entanto, os resultados promissores e a crescente busca por alimentos benéficos à saúde pelos consumidores no atual modelo sócio-econômico conduzem à necessidade de ampliar a exploração da funcionalidade do leite caprino. Tais detalhes suscitam a investigação de propriedades biológica como antioxidante, antibacteriana e antinociceptiva, atividades relevantes no que se refere a aspectos farmacológicos, de preservação da qualidade dos alimentos e combate a agentes patogênicos de importância clínica.

Sendo assim, os estudos aqui realizados objetivaram traçar o perfil proteômico comparativo da fração caseínica do leite de cabras em diferentes períodos de lactação; averiguar a atividade antinociceptiva da fração caseínica na articulação têmporomandibular de ratos; hidrolisar as proteínas da fração caseínica com as enzimas pepsina e tripsina, caracterizar os hidrolisados obtidos, e testar as atividades antioxidante e antibacteriana dos mesmos.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 OS CAPRINOS E A ESPÉCIE *Capra hircus*

Os caprinos são mamíferos herbívoros e ruminantes (BIBI, 2013) com admirável capacidade de adaptação, incluindo a muitos ambientes hostis existentes no Planeta, e com aproveitamento de forragens e subprodutos (LEVY et al., 2015).

A cabra (Figura 1), fêmea do bode, pode viver cerca de dezessete anos. Sua idade mínima para reprodução é de oito meses e a máxima, de dez anos. A gestação, geralmente uma por ano, dura em média 150 dias (MEOKAREM; JÚNIOR, 2000), com variação de dois a três dias (GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ; RIVERA, 2009). Os filhotes são chamados de cabritos e, quando adultos, podem pesar entre 45 e 70 kg (MATHIAS; NOZNICA, 2015).

Figura 1: Cabras do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), câmpus III, Bananeiras/PB.



Fonte: Arquivo pessoal. 2016.

Os caprinos, quando estão no ambiente natural, alimentam-se principalmente de gramíneas, brotos, folhas de leguminosas e grãos. Porém, podem mudar os hábitos de consumo de acordo com a disponibilidade de alimento, podendo ingerir vegetais menos aceitos por outros ruminantes (FONSECA et al., 2011).

A cabra doméstica, *Capra hircus*, criada em várias partes do mundo, é importante fonte de carne, leite, fibra e couro. Suas origens são incertas, mas, com as evidências arqueológicas, sugere-se que ter surgido a partir de duas espécies selvagens: *Capra aegagrus*, a cabra-selvagem (Figura 2A), e *Capra falconeri*, o markhor (Figura 2B), há mais ou menos

10.000 anos na região do Crescente Fértil, que inclui atualmente a Palestina, Israel, Jordânia, Kwait, Líbano, Chipre, Síria, Iraque, Egito, Turquia e Irã. (DONG et al., 2013).

A partir desse período, a *C. hircus* espalhou-se pelo mundo e teve um importante papel no desenvolvimento da agricultura no Neolítico e no avanço das civilizações humanas. Com exceção da Antártida, a cabra encontra-se distribuída em praticamente todos os demais continentes da Terra (NOMURA et al., 2013).

Figura 2: Espécies que, provavelmente, deram origem à cabra doméstica (*C. hircus*). Em A – Cabra selvagem (*C. aegagrus*); em B – Markhor (*C. falconeri*).



Fonte: <https://animalcorner.co.uk> (2017).

2.2 A CAPRINOCULTURA NO BRASIL, NORDESTE E PARAÍBA

A criação de animais é uma atividade que desempenha um importante papel na economia mundial, pois providencia bons produtos e serviços à população humana. A cabra é um dos mais importantes animais destinados a este tipo de atividade por apresentar alto potencial de adaptação a ambientes adversos (BENJELLOUN et al., 2015).

A cabra, antes sinônimo de subdesenvolvimento e pobreza, hoje tem seu leite desempenhando papel significativo na nutrição humana, área reconhecida como o berço da civilização moderna (SELVAGGI et al., 2014). O leite caprino é consumido há milhares de anos (JOHANSSON; HÖGBERG; ANDRÉN, 2015), a datar do Neolítico (SALQUE et al., 2013), sendo utilizado para a produção de lácteos desde o Antigo Egito (EDELSTEIN, 2014; SILANIKOVE et al., 2014).

No Brasil, o desenvolvimento da caprinocultura teve influência direta dos portugueses e espanhóis durante o período da colonização. Inicialmente, a prática era destinada apenas para produção de carne (DE ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014). A criação de caprinos destinados à produção de leite iniciou na década de 70 e vem se desenvolvendo desde então (FONSECA; BRUSHI, 2009).

Em 2015, o efetivo de caprinos no Brasil teve um aumento de 8,6% em relação ao valor observado em 2014, atingindo 9,61 milhões de cabeças. Deste número, a região Nordeste deteve 92,7%, onde, desse percentual, Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará foram responsáveis por 27,4%, 25,3%, 12,8% e 11,6%, respectivamente (IBGE, 2015).

Em 2016, o efetivo de caprinos do Brasil alcançou 9,78 milhões de animais, aumento de 1,7% em relação ao ano anterior. Atualmente, o setor agropecuário do Nordeste brasileiro concentra o maior percentual do rebanho caprino nacional – 9,09 milhões de animais, 93,0% do efetivo nacional (IBGE, 2017). No entanto, o seu potencial econômico ainda é indevidamente explorado, o que limita o aproveitamento e a valorização de seus produtos.

Com relação ao estado da Paraíba, em 2013, o mesmo contribuiu com 5,4% para o rebanho caprino nacional (IBGE, 2013). Nesse, foram registradas em 2014 cerca de 507.589 cabeças (IBGE, 2014), e 566.576 em 2015 (IBGE, 2015), com a maior parte da caprinocultura leiteira executada nas microrregiões dos Cariris, inseridas no Semi-Árido brasileiro, onde desempenha relevante papel sócio-econômico (SILVA et al., 2013).

Em 2014, a produção de leite caprino no Brasil alcançou cerca de 153.659 toneladas (FAOSTAT, 2017). Historicamente, a caprinocultura leiteira tem a região Nordeste como uma das mais tradicionais para a sua execução devido à fácil adaptação dos animais às condições da caatinga (DE ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014). A atividade leiteira neste tipo de condições vem ganhando espaço e tornando-se de grande importância cultural, social e econômica, desempenhando um importante papel no seu desenvolvimento (COSTA et al., 2008).

A criação de caprinos destinados à produção leiteira pode ser uma atividade bastante conveniente para as propriedades de agricultura familiar. Por exemplo, do total dos recursos financeiros repassados pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação, FNDE, no âmbito do Plano Nacional de Alimentação Escolar, PNAE, no mínimo 30% deverão ser utilizados para adquirir gêneros alimentícios diretamente da agricultura familiar (BRASIL, 2009), o que pode ser uma alternativa para o desenvolvimento da caprinocultura bem como para a geração de renda (DA FONSECA; DA SILVA; DE OLIVEIRA, 2012).

A demanda por leite caprino tem aumentado ultimamente e isso tem sido atribuído a aspectos relacionados ao seu consumo pela população de áreas rurais, ao interesse de especialistas por produtos lácteos com características sensoriais diferenciadas, e à preocupação crescente da população em geral com a saúde, em busca de alimentos nutritivos, saudáveis e com propriedades funcionais (BOMFIM et al., 2011). Atualmente, o interesse pelo leite caprino tem impulsionado inúmeras pesquisas que caracterizando o seu elevado

potencial tecnológico enfatizando as propriedades benéficas à saúde e que atendam às perspectivas de um mercado competitivo.

2.3 A RAÇA ALPINA

A cabra doméstica rapidamente se espalhou ao redor do mundo ao seguir as trajetórias de migração humana. Durante essa expansão, a espécie caprina foi se adaptando a diferentes condições climáticas e práticas de criação. Em resposta a essas pressões ambientais e antrópicas, populações localmente adaptadas emergiram, permitindo o fluxo de genes entre elas e mantendo altos níveis de diversidade fenotípica (BENJELLOUN et al., 2015).

Um considerável número de raças de cabras é reconhecido no mundo (PORTER, 2002). No Brasil, algumas delas foram introduzidas pelos colonos portugueses e, por ora, identificar as origens das populações e o quão perto os animais encontram-se de suas ascendências não é fácil (MACHADO; CHAKIR; LAUVERGNE, 2000).

A raça Alpina é uma raça exótica leiteira cuja origem está nos Alpes da Suíça e da Áustria. Começou a ser introduzida no Brasil em 1911, no estado de Pernambuco. Em 1966, importações de animais originadas de países como Alemanha, França, EUA e Inglaterra também ocorreram e seguiram até 1995, destinados a alguns estados, entre eles a Paraíba. Também foram importados sêmen e embriões do Canadá e da França, de 1985 a 1994. (ESPESCHIT, 2012; MACHADO, 2011).

Os indivíduos dessa raça apresentam características que lhes são úteis para adaptação às condições típicas da caatinga como pelos, pele, mucosa e cascos escuros. A cor escura promove maior proteção aos raios solares por conta da maior quantidade do pigmento melanina. Os cascos também fornecem maior resistência aos pés já que os terrenos na caatinga geralmente são íngremes e o solo pedregoso (ESPESCHIT, 2012).

2.4 AS PROTEÍNAS DO LEITE

Os efeitos benéficos à saúde humana, reconhecidos pela comunidade científica, são um dos fatores mais decisivos para o crescimento do consumo do leite caprino e de seus derivados. Além disso, tal produto apresenta características de fácil digestibilidade e hipoalergenicidade (PALATNIK et al., 2015).

A composição do leite de uma espécie de mamífero sugere os requisitos alimentares do recém-nascido, quando fornece os níveis e os tipos adequados de nutrientes necessários

durante tal fase dos indivíduos da respectiva espécie (O'RIORDAN et al., 2014). O leite de qualquer espécie de mamífero contém uma mistura complexa de proteínas que variam em concentração, estrutura e solubilidade. Elas são distribuídas em diferentes tipos: caseínas (na forma de micelas), proteínas do soro do leite (na forma solúvel) e proteínas da membrana dos glóbulos de gordura (EL-SALAM, 2014). As proteínas do leite fornecem nitrogênio e aminoácidos a mamíferos jovens e possuem múltiplas propriedades fisiológicas na forma intacta, além de serem fonte de peptídeos bioativos que auxiliam na saúde do jovem animal (HSIEH et al., 2015).

No leite caprino, as caseínas equivalem a aproximadamente 80% do total de proteínas, e suas quantidades e tipos são influenciadas por fatores ambientais, nutricionais, fisiológicos e genéticos (ANDRÉN; HÖGBERG; JOHANSSON, 2015). As proteínas do soro equivalem a cerca de 20% (MOHANTY et al., 2015), e as dos glóbulos de gordura, de 1 a 4% do total de proteínas do leite (EL-SALAM, 2014), também podendo variar segundo os fatores supracitados (COSTA; JIMÉNEZ-FLORES; GIGANTE, 2009).

O teor proteico do leite varia entre as espécies e reflete a taxa de desenvolvimento e crescimento da cria (FOX et al., 2015). Independente de suas concentrações, as proteínas desempenham papéis importantes para a saúde do filhote (EL-SALAM, 2014), fornecem energia, são fonte de aminoácidos para a construção e manutenção de tecidos corpóreos. Para mais, são utilizadas na indústria alimentícia, contribuindo para as propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos (CÁNOVAS et al., 2011; BERRY et al., 2014).

A hipoalergenicidade do leite caprino é uma propriedade relevante que está relacionada a aspectos quantitativos e qualitativos de suas proteínas (BALLABIO et al., 2011). Essas características têm conduzido à necessidade do desenvolvimento de estudos do perfil proteico do leite caprino, focados na identificação de diferentes variantes genéticas que codificam as frações proteicas, assim como a avaliação dos possíveis fatores externos influenciadores (MONTALBANO et al., 2014).

O uso do leite caprino como opção para pessoas alérgicas ao leite bovino também é bastante difundido. Através de um estudo realizado com crianças na China, Xu et al. (2015) concluíram que o crescimento e o estado nutricional adequados são sustentados quando o leite caprino é a principal fonte de nutrição. Obviamente, o leite materno continua a ser o alimento ideal para os bebês, mas para aqueles que não podem ser amamentados e alérgicos ao leite bovino, esse estudo mostra que o leite caprino pode ser uma alternativa cabível.

2.4.1 As proteínas da família das Caseínas

A caseína é a principal fração do leite de ruminantes, sendo um dos seus componentes mais interessantes devido ao valor nutricional e às propriedades tecnológicas (KUMAR; ROUT; MOHANTY, 2013). Essa fração é composta por um grupo de fosfoproteínas produzidas em resposta a estímulos, como os hormônios lactogênicos, e secretadas na forma de micelas, as quais são responsáveis por características físicas específicas do leite (SELVAGGI et al., 2014).

Por conta do polimorfismo genético, a caseína ocorre em diferentes tipos: caseínas α_1 , α_2 , β e κ . Suas quantidades e tipos são influenciados por fatores ambientais, nutricionais, fisiológicos e genéticos (ANDRÉN; HÖGBERG; JOHANSSON, 2015), sendo essa heterogeneidade atribuída a modificações pós-traducionais, bem como diferentes níveis de fosforilação e glicosilação (MARLETTA et al., 2007).

As caseínas contêm número variável de radical fosfato ligado à serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, o que faz originar regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas nas moléculas (SGARBIERI, 2005). Algumas caseínas também são mais solúveis na presença de cálcio (SELVAGGI et al., 2014). Assim, a função das caseínas é o transporte de fosfato e cálcio no leite para o lactente, sendo uma fonte desses minerais para formação óssea (STEWART et al., 1987), bem como fonte de aminoácidos para atender as exigências orgânicas do indivíduo em crescimento (CÁNOVAS et al., 2011).

As caseínas são proteínas segregadas e possuem peptídeos sinalizadores nas regiões N-terminais, os quais direcionam a passagem das moléculas recém-sintetizadas para o lúmen do retículo endoplasmático para, então, remover os peptídeos sinais dos produtos primários de tradução, produzindo assim as proteínas maduras. Alguns estudos com o leite bovino têm feito os pesquisadores reconhecerem que essas proteínas também podem funcionar como chaperonas moleculares (MORGAN et al., 2005; TREWEEK, 2012; HOLT et al., 2013).

Das características que fazem o leite caprino ser distinto do bovino, o menor tamanho das micelas de caseínas e o baixo nível de caseína α_1 estão entre as mais exploradas pelo comércio (KUMAR et al., 2016). Costa et al. (2014) averiguaram que o leite produzido por cabras Alpinas e Saanen criadas no Nordeste do Brasil não apresentam α_1 -caseína. Tais propriedades fazem do leite caprino hipoalergênico e de boa digestibilidade quando comparado ao bovino.

Desta maneira, embora muitos estudos venham explorando as proteínas do leite caprino, pesquisas relacionadas à proteômica das caseínas do leite de cabras criadas no Nordeste do Brasil são necessários, tornando válida a exploração do campo.

2.5 PEPTÍDEOS DO LEITE

As evidências científicas de que os componentes da dieta e seus fragmentos podem exercer muitas outras funções que estão além da função nutricional básica estão cada vez mais fortes (RONQUILLO, 2012). Logo, as proteínas do leite podem afetar processos fisiológicos no organismo, exercendo benefícios para a função orgânica (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015).

As proteínas lácteas são compostos orgânicos de alto valor biológico que apresentam em sua composição peptídeos com diferentes funções biológicas (GARCÍA et al., 2014; PEREIRA, 2013). O número de peptídeos bioativos identificados em hidrolisados de proteínas do leite vem crescendo e, em vista disso, estão sendo consideradas como fonte mais importante de peptídeos (KANWAR et al., 2015).

Peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite geralmente possuem de dois a vinte resíduos de aminoácidos e tornam-se ativos após a hidrólise da proteína precursora durante a digestão gastrointestinal ou hidrólise *in vitro* (MOHANTY et al., 2015). A abordagem *in vitro* definida para produção de peptídeos permite estabelecer a combinação entre as condições de hidrólise e a protease específica a ser utilizada, resultando na degradação de ligações peptídicas entre aminoácidos específicos ou não, produzindo sequências que poderão ser funcionalmente ativas. Variações na temperatura, enzimas e tempo afetam os tipos e a atividade dos peptídeos obtidos devido à sequência gerada (KUSUMANINGTYAS et al., 2016).

Vale destacar que, embora o perfil peptídico das proteínas do leite humano e bovino tenha sido bastante explorado no campo das pesquisas da proteômica (RONCADA et al., 2012), estudos desse tipo também têm sido conduzidos com o leite de outras espécies de mamíferos (HSIEH et al., 2015; MAO et al., 2011). A hidrólise *in vitro* tem sido largamente realizada no leite bovino (LISSON et al., 2014), ovino (CAVALLI et al., 2008), de jumenta (TIDONA et al., 2011; BIDASOLO et al., 2012), de búfala (ABDEL-HAMID et al., 2017) e, inclusive, caprino (AHMED et al., 2015; ESMAEILPOUR et al., 2016).

Essas técnicas permitem obter peptídeos derivados de fontes inócuas e de baixo custo, podendo ter grande potencial a ser empregado na medicina e na indústria de alimentos (BHAT, KUMAR, BHAT, 2015). Com pesquisas realizadas *in vitro* e em modelos animais,

os estudiosos relataram que peptídeos derivados de caseínas apresentam potencial atividade biológica.

Peptídeos bioativos já foram identificados em proteínas do soro de leite caprino e produzidos por hidrólise enzimática (AHMED et al., 2015). No entanto, a biofuncionalidade do mesmo ainda é pouco explorada (ALBENZIO; SANTILLO, 2011; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011).

As proteínas do leite caprino também incluem peptídeos com atividades antioxidante (LI et al., 2013; AHMED et al., 2015), antibacteriana (ESMAEILPOUR et al., 2016), imunomoduladora (ERIKSEN et al., 2008) e inibidor da enzima de angiotensina (ESPEJO-CARPIO et al., 2013; QUIRÓS, et al., 2005). Tais atividades são particularmente interessantes devido à potencial capacidade de prevenir ou retardar a deterioração microbiológica e oxidativa dos alimentos, deste modo, prolongando a vida de prateleira, fator de importância considerável para o mercado. Por serem compostos que possuem em sua composição peptídeos que afetam e fortalecem a resposta imunológica do organismo modulando o sistema imunológico, podem também agir no controle da hipertensão.

Apesar de diversas atividades biológicas já terem sido relatadas com leite caprino, a atividade antibacteriana não foi totalmente explorada, assim como as propriedades do tipo anti-inflamatória e antiproliferativa. O leite de outras espécies de ruminantes apresenta atividades relacionadas como: proteínas e hidrolisados do leite bovino podem apresentar capacidade de inibição de tumores (PEPE et al., 2015); e hidrolisados de caseína do leite de fêmeas iaques reduzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias (HSIEH et al., 2015; MAO et al., 2011).

As características composicionais do leite de diferentes espécies mamíferas podem ser ainda influenciadas por diversos fatores como raça, estágio de lactação, alimentação do animal, sistema de criação, genética, fisiologia e condições ambientais (GOFF, 2015). Consequentemente, o interesse no estudo de animais de raças regionais torna-se relevante não só pela herança genética, mas pela possibilidade de caracterizar a composição do leite, fatores que poderão contribuir para o desenvolvimento e a sobrevivência da agricultura em áreas marginais (SANTILLO et al., 2009), bem como para uma maior agregação de valor para essa matriz alimentar.

Observa-se que pesquisas para avaliar o perfil peptídico e o potencial bioativo de peptídeos provenientes de leite caprino de raças regionais, atendendo ao aprofundamento no estudo da proteômica com ênfase no seu potencial funcional ainda não foram propostas,

tornando válidos os estudos específicos focados nas formas adequadas de se pesquisar sobre a qualidade do leite caprino (GARCÍA et al., 2014).

2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.6.1 Atividade antibacteriana

As doenças veiculadas por alimentos podem ser de natureza infecciosa ou tóxica, provocadas por patógenos como bactérias, vírus e parasitas, ou substâncias químicas. Os agentes entram no organismo por meio de água ou alimentos contaminados e podem causar diarreia grave ou infecções debilitantes, intoxicações agudas ou doenças a longo prazo, como o câncer. Exemplos de alimentos inseguros incluem os não cozidos de origem animal, frutas e legumes contaminados com fezes, e mariscos crus contendo biotoxinas marinhas (WHO, 2017). Entre as bactérias mais comuns associadas a doenças transmitidas por alimentos estão as pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia* e *Staphylococcus*.

Salmonella é um gênero de bactéria considerada um dos principais causadores de doenças transmitidas por alimentos no mundo (WHO, 2017). As salmonelas pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo o gênero de maior relevância nesse grupo taxonômico. São bactérias Gram-negativas bem adaptadas aos seres humanos, bovinos, suínos, equinos e aves. Provocam a salmonelose, uma doença complexa em sua epidemiologia e controle, pois os padrões diferem de uma região para outra, de acordo com as diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais, padrões de higiene e saneamento. Produtos agrícolas não processados, como hortaliças e frutas, e alimentos de origem animal, como carnes cruas, leite e ovos são veículos frequentes de salmonelas (BRASIL, 2011).

Desde a sua descoberta, *Listeria monocytogenes* foi identificada como uma das principais causas de surtos de origem alimentar. Pertencente à família Listeriaceae, a espécie inclui bactérias Gram-positivas que provocam a listeriose e podem crescer inclusive em alimentos com baixo teor de umidade, alta concentração de sal e em temperatura de refrigeração (NOORDHOUT et al., 2014).

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae e abrange bactérias Gram-negativas comensais encontradas no intestino de humanos e outros animais. As cepas patogênicas podem causar infecções hospitalares associadas ao intestino e trato urinário, meningite, peritonite e septicemia (VOM BAUM; MARRE, 2005). Podem ser transmitidas

através do consumo de alimentos contaminados, como carne moída crua ou pouco cozida, leite cru e vegetais, e brotos crus (WHO, 2017).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é Gram-positiva e pertence à família Staphylococcaceae, podendo crescer em condições aeróbias ou anaeróbias. É encontrada no meio ambiente e na flora humana normal, principalmente na pele e nas mucosas (mais frequentemente a área nasal) da maioria dos indivíduos saudáveis (TAYLOR; UNAKAL, 2018). Aproximadamente 30% da população humana é colonizada por *S. aureus*. Simultaneamente, é um líder causa de bacteremia e endocardite infecciosa, bem como osteoarticular, pele e tecidos moles (TONG et al., 2015).

As taxas de mortalidade provocadas por doenças infecciosas, tanto em humanos como em animais, foram reduzidas a partir do uso de antimicrobianos (LAGARDA-DÍAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). No entanto, as bactérias patogênicas podem, naturalmente, adquirir resistência aos antimicrobianos, e o uso indiscriminado pode agilizar o processo de resistência (SILVA et al., 2016), tornando-se uma ameaça à saúde pública que pode atingir grandes proporções, o que acaba por exigir ação imediata (PENESYAN; GILLINGS; PAUSEN, 2015), fatores que tornam válida a busca de novas substâncias para combater doenças infecciosas.

A atividade antimicrobiana de peptídeos bioativos derivados da hidrólise *in vitro* de proteínas do leite de várias espécies, inclusive no caprino, vem sendo descrita na literatura e pode ser uma solução alternativa na busca de antimicrobianos que combatam bactérias patogênicas, importantes por se tratarem de agentes relacionados a surtos provocados pela ingestão de alimentos contaminados.

2.6.2 Atividade antinociceptiva na articulação têmporo-mandibular

A articulação têmporo-mandibular (ATM) é uma articulação sinovial que conecta a mandíbula ao crânio. As duas articulações estão localizadas na frente de cada orelha. Os movimentos permitidos são os de um lado para o outro, para cima e para baixo, bem como protusão e retrusão. Essa articulação, juntamente com seus músculos anexados, permite os movimentos necessários para a fala, mastigação e expressão facial (DUGASHVILLI et al., 2013).

As disfunções têmporo-mandibulares (DTM) compreendem uma série de condições musculoesqueléticas e neuromusculares que envolvem as articulações têmporo-mandibulares, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados (GREENE, 2010).

Embora a expressão seja usada para referir-se a um processo de doença, tecnicamente a DTM não o é. Na verdade, abrange uma série de manifestações da estrutura alterada e/ou desempenho de tecidos articulares e periarticulares que podem surgir a partir de diversas causas (SINGH, 2017).

Os sinais e sintomas associados a essas disfunções podem incluir dificuldade na mastigação, fala, ou em outras funções orofaciais. Estão frequentemente associadas com dor aguda ou persistente, e o paciente também pode sofrer de outras desordens dolorosas (comorbidades). As formas crônicas das DTM dolorosas podem acarretar afastamento ou incapacidade no trabalho ou em atividades sociais (GREENE, 2010), resultando em diminuição da qualidade de vida de forma geral (AHMED et al., 2013).

Muitos modelos experimentais de inflamação articular foram descritos, fornecendo ferramentas para estudar os mecanismos subjacentes a essas condições inflamatórias e permitindo a descoberta de novos compostos candidatos a anti-inflamatórios e analgésicos (CONTE et al., 2015).

Algumas substâncias como polissacarídeos sulfatados das algas *Gracilaria córnea* (COURA et al., 2015) e *Solieria filiformis* (ARAÚJO et al., 2017); e proteínas como a lectina de *Abelmoschus esculentus* (FREITAS et al., 2016) e da alga verde *Caulerpa cupressoides* (RIVANOR et al., 2014) apresentam atividade antinociceptiva em modelos de inflamação da articulação têmporo-mandibular de ratos. Contrariamente, ainda não há informações na literatura sobre a atividade relacionada com proteínas e peptídeos derivados de proteínas do leite caprino, o que torna pertinente a pesquisa nessa área.

2.6.3 Atividade antioxidante

Radicais livres são pequenas moléculas altamente reativas por conta do elétron desemparelhado. Pensava-se que eram radicais centrados apenas no oxigênio, denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), mas também incluem as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo todos produtos do metabolismo celular normal (IFEANYI, 2018).

As células eucarióticas produzem energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) por meio de vias metabólicas, como o ciclo do Krebs e a cadeia transportadora de elétrons, que levam à redução final do oxigênio molecular (O₂). A operação dessas vias metabólicas gera espécies reativas e leva à síntese de radicais livres (NEWSHOLME et al., 2016).

Porém, a síntese excessiva dessas espécies reativas, como EROs, conduz ao estresse oxidativo, que pode danificar os componentes celulares e causar sua disfunção. O estresse

oxidativo pode ser desencadeado pelo desequilíbrio entre a geração de EROs e a desintoxicação devido ao desequilíbrio na fisiologia celular; e pela biossíntese de EROs como parte constituinte da sinalização de estresse e resposta imunológica necessária para defesa e adaptação. Esses mecanismos coexistem porque os fatores de estresse que produzem diretamente EROs estimulam adicionalmente a sua geração pelas NADPH oxidases e peroxidases (DEMIDCHIK et al., 2015).

Os danos induzidos por radicais livres no estresse oxidativo foram confirmados como contribuintes para a patogênese e patofisiologia de muitos problemas crônicos de saúde (PISOSCHI; POP, 2015). Desse modo, a inibição da formação de radicais livres fornece uma estratégia terapêutica para prevenir o estresse oxidativo. Antioxidantes podem agir de diferentes modos, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio, sequestrando radicais livres, aumentando a capacidade de defesa enzimática (SRUTI et al., 2017) ou reduzindo íons metálicos.

O organismo possui defesas naturais contra o estresse oxidativo, mas antioxidantes exógenos presentes em alimentos, como os aminoácidos das proteínas, podem auxiliar no processo (PISOSCHI; POP, 2015).

O aumento das demandas dos consumidores por aplicações seguras de produtos orais e tópicos ricos em antioxidantes leva ao aumento da necessidade de busca por novas fontes de antioxidantes naturais para substituir as sintéticas, com o objetivo de descoberta de novas oportunidades na prevenção e/ou tratamento do envelhecimento e na prevenção e/ou tratamento de muitas doenças causadas por radicais livres (STOJILJKOVIC; ARSIC; TADIC, 2016).

Vegetais são ricos em compostos antioxidantes como compostos fenólicos (MAQSOOD et al, 2014). No entanto, os estudos têm reportado que peptídeos derivados de proteínas, tanto de origem vegetal como animal, também podem exercer atividade antioxidante. Entre as fontes proteicas estão as de origem animal, como o leite de diferentes espécies de mamíferos inclusive os gerados por hidrólise enzimática das caseínas de leite caprino já foram identificados (AHMED et al., 2015). No entanto, a hidrólise *in vitro* permite o controle das variáveis como pH e temperatura, o que permite originar diferentes tipos de peptídeos.

A hidrólise enzimática das caseínas gera peptídeos que são ricos em resíduos de fosfoserina. O mecanismo proposto de atividade antioxidante está ligado à presença de grupos fosfato originários dos resíduos de fosfoserina em estreita proximidade com a cadeia péptica,

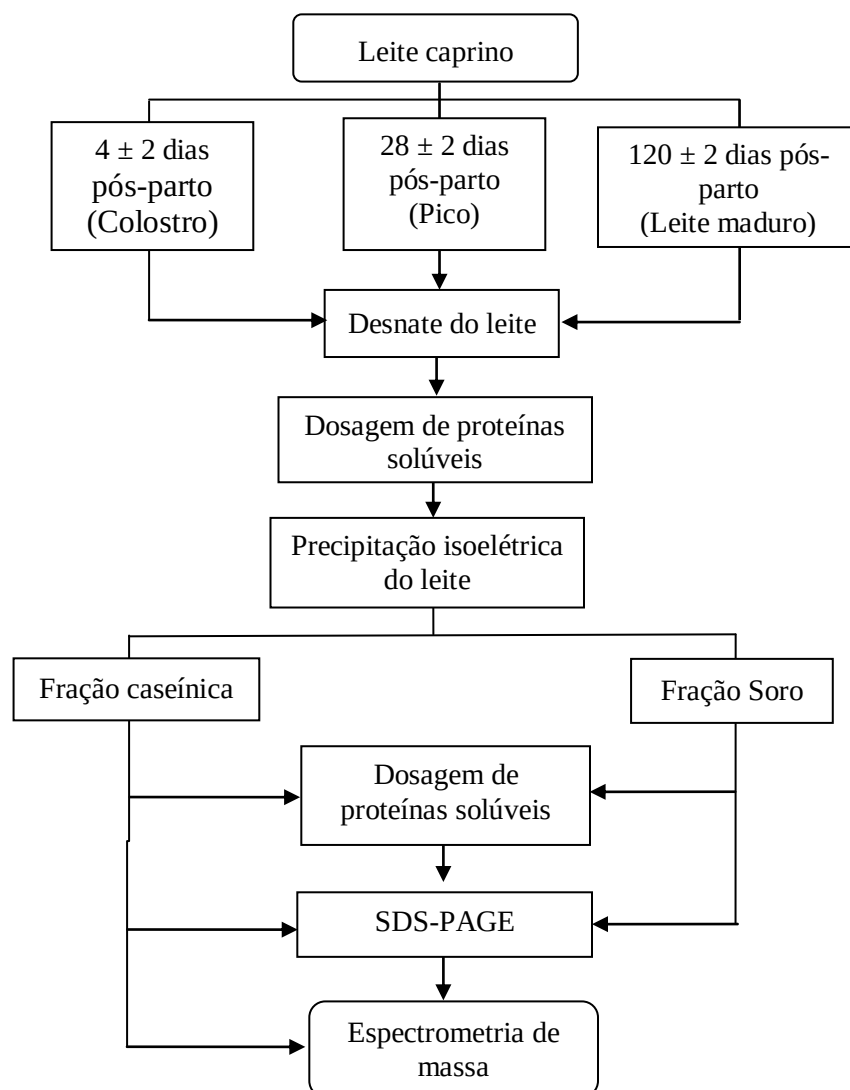
o que cria um domínio polar e aniônico que pode sequestrar íons metálicos catiônicos (AWAD et al., 2016).

Phelan et al. (2009) descobriram que os hidrolisados de caseína bovina afetam a atividade da catalase celular e o conteúdo de glutathiona em células *Jurkat*, além de um certo grau de capacidade de doação de elétrons, conforme determinado pelo ensaio do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

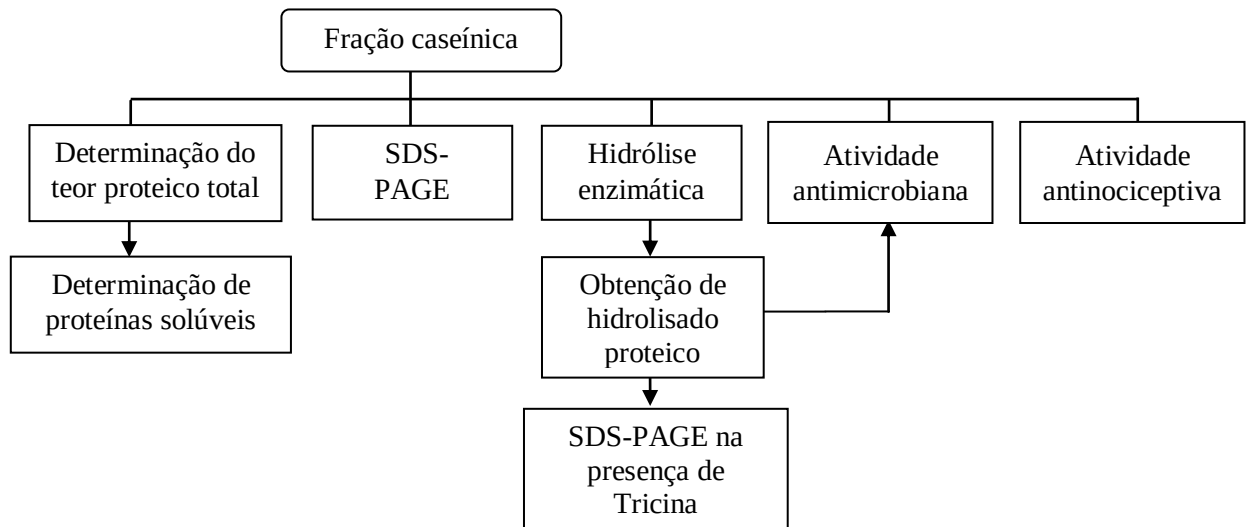
Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR-Lab); no Laboratório de Combustíveis (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), câmpus I; na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); e na Universidade Federal do Ceará (UFC), câmpus Sobral. As atividades executadas estão resumidas nas figuras 3, 4 e 5.

Figura 3: Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas com o leite caprino coletado em diferentes períodos de lactação.



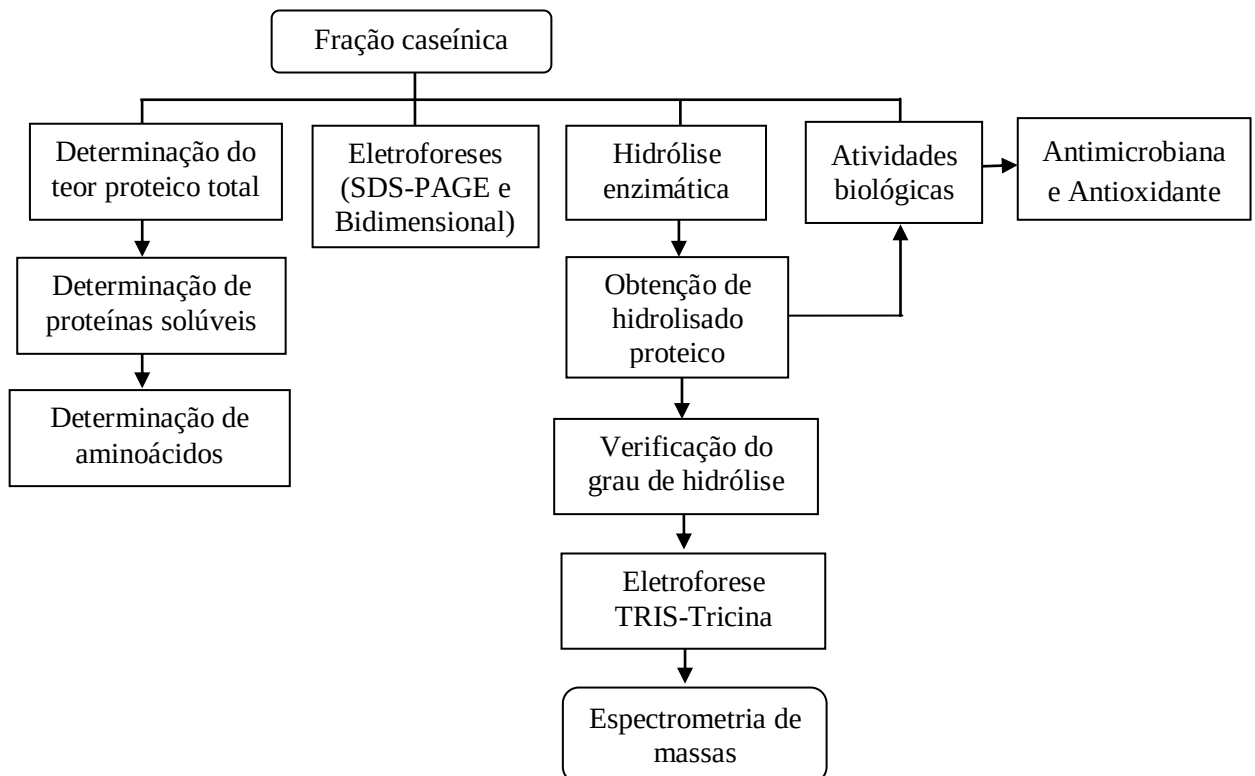
Fonte: Autor, 2018

Figura 4: Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas com a fração caseínica do leite caprino coletado com 28 ± 2 dias pós-parto (pico de lactação).



Fonte: Autor, 2018.

Figura 5: Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas com a fração caseínica do leite caprino coletado com 120 ± 2 dias pós-parto (leite maduro).



Fonte: Autor, 2018.

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO

As amostras de leite caprino foram obtidas do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da UFPB, câmpus III, município de Bananeiras/PB, (latitude 6° 45' 4" Sul; longitude 35° 38' 0" Oeste), em três períodos distintos pós-parto, nos meses de janeiro e março: 4 ± 2 dias (coloostro); 28 ± 2 (pico de lactação); e 120 ± 2 (leite maduro). Os animais, pertencentes à raça alpina, pesavam cerca de 40 ± 6 kg e eram alimentados com ração comercial.

3.2 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE CAPRINO

As amostras de leite foram desnatadas por centrifugação a $4856 \times g$, a 4°C (NT 815 Novatecnica) e submetidas à precipitação isoelétrica mediante adição de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L (EGITO et al., 2006), até atingir o pH 4,1 (CEBALLOS et al., 2009), obtendo-se, assim, o soro e o precipitado proteico, correspondente à fração caseínica (FCN).

O precipitado proteico foi lavado três vezes com água destilada e solubilizado com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, em pH 9,0 para determinar o teor proteico solúvel. Em seguida, foi dialisado contra água destilada em membrana de celulose (*cut-off* 14 kDa), congelado a -4°C e liofilizado (modelo Liotop L101).

3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DA FRAÇÃO CASEÍNICA

A caracterização química parcial (umidade, cinzas, proteína total) da FCN dos leites coletados nos diferentes períodos de lactação foi determinada de acordo com os métodos da Associação Oficial de Químicos Analistas (AOAC, 2000).

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR PROTEICO SOLÚVEL

O teor de proteínas solúveis presentes nas amostras de leite, FCN e soro foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), no qual as amostras foram diluídas em diferentes concentrações de NaCl 0,15 mol/L (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:360).

De cada diluição foi retirada uma alíquota de 100 μL , em duplicata, onde foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. Após homogeneização e repouso por 10 min, foi

feita a leitura das amostras a 595 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro Amersham Biosciences). Como padrão, utilizou-se uma curva de BSA – Soro albumina bovina.

3.5 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS

A composição de aminoácidos da FCN do leite caprino coletado com 120 ± 2 dias pós-parto foi determinada segundo White; Hart; Kry (1986). A FCN foi submetida à derivatização em pré-coluna de aminoácidos liberados após a hidrólise ácida das proteínas (HCl 6 mol/L), sob aquecimento (115 °C/22 h). A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 – Luna – Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA).

A identificação dos aminoácidos foi realizada por comparação com padrão externo (Pierce, PN 20088), e para a quantificação foi utilizado o padrão interno ácido α -aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), de acordo com White; Hart; Kry (1986) e Hagen; Frost; Augustin (1989). A determinação de triptofano foi feita após hidrólise enzimática com pronase (40 °C/22-24 h), seguido de reação colorimétrica com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em 10,55 mol/L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e leitura a 590 nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão de L-triptofano (SPIES, 1967).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO

3.6.1 SDS-PAGE

Para caracterizar o perfil proteico e estimar a massa molecular das proteínas das amostras, foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS- PAGE (Sistema Loccus Biotecnologia. Model: Vert-i10), segundo a metodologia de Laemmli (1970).

O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 3,5 % de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8 e SDS 1%, e o gel de separação na concentração de 20% em tampão Tris-HCl 3 mol/L, pH 8,8 e SDS 1%.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,625 mol/L, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10%, 5% de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol a 0,02%, aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 min, e centrifugadas por 2 min. Alíquotas de 8 µL de cada

amostra foram aplicadas nos poços do gel de empilhamento, e a corrida ocorreu nas condições de 200 V; 25 mA e 15 W. O tampão de corrida foi preparado com glicina 0,2 mol/L; Tris 0,025 mol/L e SDS 10%, com pH 8,3.

Ao final da corrida, o gel foi fixado com solução de metanol, ácido acético e água (40/10/50), durante 45 min. Em seguida, corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 0,005% *overnight*.

O gel foi descorado com água destilada morna e digitalizado em scanner *Image Scanner III* (GE Healthcare Bio-Sciences, WI, USA). As massas moleculares do marcador proteico utilizado como padrão variaram de 225 a 12 kDa (*Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range*, GE Healthcare Life Sciences).

3.6.2 Eletroforese bidimensional

A eletroforese em duas dimensões (2-DE) foi realizada apenas com a FCN do leite caprino coletado com 120 ± 2 dias pós-parto, de acordo com a metodologia descrita por O'Farrel (1975); Klose (1975). No procedimento, solubilizou-se 1 mg de amostra em solução constituída por ureia 7 mol/L, tiourea 2 mol/L, 0,5 % de tampão *Immobilized pH gel* (IPG), ditioneitol (DTT), 2 % de CHAPS e 0,002 % de azul de bromofenol. O *strip* não linear de 13 cm, pH de 3 a 11, foi reidratado em *IPGbox* por 18 h, a ± 25 °C (GE Healthcare, WI, USA). Decorrido esse tempo, o *strip* foi submetido à focalização isoeletrica (IPGPhor Healthcare® GE III), após o que foi armazenado em solução de Tris-HCl 1,5 mol/L, pH 8,8, com 1 mL de SDS 10 % (HEALTHCARE, 2010).

No dia seguinte, o *strip* foi retirado da solução de armazenamento e submetido ao equilíbrio em solução com DTT e iodacetamida. Em seguida, transferido para um gel com 15% de poliacrilamida. A corrida foi realizada a 100 V, 30 mA e 50 W. O marcador proteico utilizado como padrão foi o mesmo utilizado na eletroforese unidimensional SDS-PAGE.

Ao final da corrida, o gel foi fixado com solução de ácido acético, etanol 95% e água mili-Q (10/40/50), e corado com *Coomassie Brilliant Blue* G-250 2%, por 72 h. Após sua descoloração, com solução de metanol; ácido acético e água destilada (20/10/70), o gel foi digitalizado em scanner *Image Scanner III* (GE Healthcare Bio-Sciences, WI, USA), e os *spots* detectados e identificados pelo software *ImageMasterTM2D Platinum 7.0* (GE Healthcare Bio-Sciences, WI, USA).

3.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* DA FRAÇÃO CASEÍNICA DO LEITE CAPRINO

A FCN do leite caprino coletado com 28 ± 2 dias pós-parto foi submetida à hidrólise enzimática *in vitro* com pepsina seguida de tripsina. A amostra liofilizada foi solubilizada em água destilada (1 mg/mL; m/v) e teve seu pH ajustado para 2. Após isto, realizou-se incubação da caseína com a enzima pepsina (1:50 – E:S; v/v), durante 30 min, a 37 °C, sob agitação constante. Decorrido esse tempo, a amostra foi levada ao banho de gelo e seu pH ajustado para 8,0, após o ajuste a tripsina foi adicionada na proporção de 1:50 – E:S (v/v). A amostra foi incubada por mais 1 h, a 37 °C, sob agitação constante (150 rpm). Findo o tempo, a reação foi inativada por aquecimento a 95 °C durante 5 min, a amostra foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 10.000 rpm. O sobrenadante equivaleu ao hidrolisado, que foi dialisado contra água destilada em membrana de celulose (*cut-off* 500 Da), congelado a –4 °C e liofilizado (modelo Liotop L101).

A FCN do leite caprino coletado com 120 ± 2 dias pós-parto foi submetida à hidrólise enzimática *in vitro* com pepsina e tripsina, separadamente. A FCN foi solubilizada em água (1 mg/mL; m/v) e teve o pH ajustado para 2,5 com HCl, para hidrólise com pepsina, e pH 8,0 com NaOH, para hidrólise com tripsina.

A FCN solubilizada e com o pH ajustado foi incubada com uma solução de enzima (1:50 – E:S; v/v), a 39 °C e 38 °C, para pepsina e tripsina, respectivamente, sob agitação constante (150 rpm), durante 2 h. Ao final do tempo, as reações foram interrompidas com aquecimento a 95 °C por 5 min. As amostras foram resfriadas e centrifugadas a 10.000 rpm. O sobrenadante equivaleu ao hidrolisado, que foi dialisado contra água destilada em membrana de celulose (*cut-off* 500 Da), congelado a –4 °C e liofilizado (modelo Liotop L101).

3.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

O grau de hidrólise dos hidrolisados foi determinado pelo método do *o-phthaldialdehyde* (OPA) segundo Church et al. (1983). No teste, alíquotas de 100 µL de cada hidrolisado (1 mg/mL em água destilada) foram adicionadas a 750 µL do reagente OPA (25 mL de tetraborato dissódico decahidratado 100 mmol/L; 2,5 mL de SDS 20 %; 40 mg de OPA dissolvido em 1 mL metanol, e 100 mL de β-mercaptoetanol, ajustado ao volume final de 50 mL com água destilada), preparado no momento de uso.

Os sistemas foram homogeneizados e incubados por 2 min a temperatura ambiente e a absorbância lida a 340 nm em espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro (Amersham, Biosciences). Como padrão foi usado o aminoácido serina (50 mg em 500 mL de água destilada – 0,1 mg/mL ou 0,9516 meqv/L).

Todas as leituras foram realizadas em triplicatas, e o cálculo do grau de hidrólise foi realizado conforme a equação 1 (NIELSEN; PETERSON; DAMBMANN, 2001):

$$DH = h / h_{hot} \times 100\% \quad (1)$$

O valor de h foi calculado por meio da equação 2:

$$h = \frac{(\text{serina-NH}_2 - \beta)}{\alpha} \quad (2)$$

Os valores de α e β , obtidos experimentalmente por Adler-Nissen (1979), são os coeficientes angular e linear, respectivamente, da correlação entre serina NH₂ e h para caseína; e o valor de serina-NH₂ foi calculado com a equação 3:

$$\text{Serina-NH}_2 = \frac{DO_a - DO_b}{DO_p - DO_{bp}} \times 0,9516 \times \frac{0,1 \times 100}{m \times P} \text{ L/g proteína} \quad (3)$$

Onde:

- DO_a – Densidade óptica da amostra;
- DO_b – Densidade óptica do branco da amostra;
- DO_p – Densidade óptica do padrão;
- DO_{bp} – Densidade óptica do branco padrão.

3.9 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO

3.9.1 SDS-PAGE na presença de Tricina

Os peptídeos gerados pela hidrólise enzimática tiveram sua massa molecular aferida por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Tricina (SDS-PAGE Tris-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 % C).

As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,625 mol/L, pH 6,7, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol, aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 min e centrifugadas por 5 min. Alíquotas de 15 μ L

foram aplicadas nos poços do gel de empilhamento e as corridas ocorreram nas condições de 110 V, 25 mA e 7 W.

Finda a corrida, o gel foi fixado com solução de metanol, ácido acético e água (5/1/4), durante 1 h e, em seguida, corado com solução de *Coomassie brilliant blue* G-250 (0,025% de *Comassie* em ácido acético 10%) durante 48 h. Posteriormente, o corante foi removido com solução de ácido acético 10%.

Os marcadores proteicos utilizados como padrões apresentavam massas moleculares de 38 a 3,5 kDa (*Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range*, GE Healthcare Life Sciences).

3.10 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa foi realizada nas amostras de FCN obtidas da precipitação isoeletrica dos leites coletados nos três períodos de lactação. Para a análise, foi realizado a quantificação de proteínas solúveis. Cerca de 300 µg de cada amostra foram solubilizados em bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mmol/L, pH 7,8, para se obter a concentração final de 1 µg/µL. A solução foi incubada a 90 °C durante 5 min para desnaturação térmica, seguida de redução com DTT 5 mmol/L (concentração final) durante 30 min, a 60 °C; e alquilação com iodoacetamida numa concentração final de 15 mmol/L, durante 90 min a 37 °C, no escuro.

A mistura de grau de sequenciação Trypsin/LysC foi adicionada na razão 1:75 (enzima/substrato), e a solução incubada por 16 h, a 37 °C. As amostras foram concentradas num concentrador de vácuo a 20 °C e congeladas a -20 °C até a execução da análise.

As misturas de peptídeos foram ressuspensas em solução de acetronitrila 2 % com 0,1% de ácido fórmico, e submetidas à análise de nLC-ESI-MS/MS (Cromatografia Líquida em Nano Escala com Ionização por *Electrospray* acoplada à Espectrometria de Massas em *Tandem*), realizada em sistema NanoLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massa MaXis II (Bruker Daltonics).

Os peptideos foram retidos na coluna Acclaim Pepmap nano-trap (Dionex-C18, 100 Å, 75 µm x 2 cm) e separados em linha usando a coluna analítica Acclaim Pepmap RSLC (Dionex-C18, 100 Å, 75 µm x 15 cm) sob gradiente eluição de 2 a 98 % (v/v) de acetonitrila 0,1 % de ácido trifluoroacetico durante 180 min, e o fluxo ajustado para 300 nL/min.

Os espectros de massa foram adquiridos no modo de íons positivos com precursores de MS e produtos MS/MS adquiridos a 2 Hz na faixa de massa de 50-3000 m/z e os parâmetros de energia de dissociação induzida por colisão (CID) aumentaram entre 7 e 70 eV.

3.11 PESQUISA NAS BASES DE DADOS

Os arquivos de dados MS brutos (.d *file*) contendo os espectros MS/MS foram importados no software PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, Canadá) para análise *de novo* e pesquisa em banco de dados (ZHANG et al., 2012). A análise *de novo* foi realizada com tolerância de massa precursora de 10 ppm, tolerância de massa de fragmento de 0,025 Da, tripsina como enzima específica de duas falhas de clivagens. A carbamidometilação de cisteína (+57,02) foi definida como modificação fixa juntamente com a oxidação da metionina (+15,99) como modificação variável.

Uma vez que para proteínas provenientes de leite caprino há poucas sequências na base de dados pesquisados, os peptídeos sequenciados *de novo* com pontuação média de confiança local (ALC) $\geq 50\%$ foram selecionados e submetidos a buscas em banco de dados usando ferramentas SPIDER contra o banco de dados *Capra hircus* da Uniprot KB (2828 sequências, acessadas em 10 de agosto de 2017 de <http://www.uniprot.org/>) na primeira rodada e contra a base de dados *Ruminantia* da Uniprot/Swiss-prot (7116 sequências, acessadas em 20 de agosto de 2017 a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) na segunda rodada. As taxas de falsa descoberta (*False Discovery Rate* – FDRs) para proteínas e peptídeos foram fixadas em um máximo de 1 %. Todas as proteínas identificadas têm pelo menos um peptídeo e peptídeos únicos com cinco íons apresentados nos espectros.

3.12 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.12.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana da FCN e dos hidrolisados (HDP e HDT) foi testada segundo as normas do protocolo M7-A6 do *National Comitê For Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (2003), por meio da técnica de Microdiluição em Caldo, com as linhagens *E. coli*, *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Todo o trabalho de manuseio das culturas bacterianas foi realizado em Cabine de Segurança Microbiológica Classe II A1 (Filterflux).

O inóculo foi preparado em 4 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI), a 37 °C, até se obter aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, escala de *Mc Farland* de 0,5.

Para o teste antimicrobiano foram usadas microplacas de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) de fundo chato com 96 poços. Cada poço recebeu 100 µL de meio.

Em seguida, foram distribuídos 100 µL da amostra (1 mg/mL; m/v em água destilada) e, desta mistura, feitas diluições seriadas em triplicata. Em seguida, foram adicionados 20 µL de suspensão bacteriana (10^6 UFC mL⁻¹) em cada poço contendo a amostra diluída no meio.

O controle negativo abrangeu apenas o meio, e o positivo, bactéria e o meio. A placa foi incubada a 37 °C em espectrofotômetro *Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific), e o crescimento bacteriano foi monitorizado pela medida da absorbância a 630 nm, a cada 60 min, durante 24 h.

Os resultados foram registrados através do incremento na densidade óptica (média das leituras de Abs 630 nm) de cada micro-organismo em função do tempo, em horas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi obtida e considerada como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano.

3.12.2 Atividade antinociceptiva

O protocolo experimental foi elaborado conforme o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, câmpus Sobral, sob nº 05/17.

3.13.2.1 Animais de experimentação

No ensaio de atividade antinociceptiva foram utilizados ratos machos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade *Wistar*, com massa corporal entre 270-320 g, oriundos do biotério central da UFC. Os animais ficaram alojados no Biotério Setorial da UFC, câmpus Sobral, até o início dos experimentos, recebendo água e alimentação *ad libitum*, a 23 ± 2 °C e sob ciclos de claro-escuro de 12 h.

3.12.2.2 Injeção intra-articular de formalina

Os animais foram brevemente anestesiados com isoflurano, por inalação, e receberam uma injeção intra-articular do agente inflamatório formalina, 1,5 %/50 µL (ROVERONI et al., 2001). Para administração do agente na articulação têmporo-mandibular (ATM), uma agulha calibre 30 G, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µL) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático

da ATM esquerda, sendo avançada em direção anterior, até contatar a região pósterio-lateral do côndilo.

3.12.2.3 Teste comportamental para avaliação das respostas nociceptivas

As análises comportamentais foram realizadas durante a fase clara, entre 7 h e 16 h, em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 23 ± 2 °C (ROSLAND, 1991). Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados por um período de sete dias. Para as análises comportamentais, foi usada uma caixa de observação medindo 30 x 30 x 30 cm, com base e três laterais espelhadas e frente de vidro.

Cada animal foi, inicialmente, colocado e mantido na caixa por 10 min para habituar-se ao ambiente e ter o estresse minimizado. Imediatamente após a injeção intra-articular, o animal, já consciente, foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais, caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira; e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça, foram quantificadas durante 45 min, para formalina, divididos em blocos de 3 min.

O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado com um cronômetro, e o número de vezes que levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células. Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (ROVERONI et al., 2001).

Imediatamente após as análises comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação para que, assim, pudesse ser feita a coleta de tecidos biológicos para posterior análise.

3.12.2.4 Efeito da fração caseínica na hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos

Os animais foram pré-tratados por via oral (v.o.) com a amostra de FCN nas doses de 0,1 e 1 mg/kg. Após 1 h do pré-tratamento, receberam a injeção intra-articular (i. art) de formalina (1,5%/50 µL), e a resposta comportamental nociceptiva foi quantificada. O grupo salina recebeu *per os* o veículo (salina 0,9 %) 1 h antes da injeção intra-articular de salina estéril 0,9 %.

O grupo Formalina representa animais que receberam *per os* o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (i. art) de formalina (1,5 %/articulação; 50 µL). Imediatamente após as análises comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação, e os tecidos periarticulares foram removidos e processados para posteriores análises bioquímicas.

3.13.4 Atividade antioxidante

3.13.4.1 Atividade antioxidante através da captura do radical 2,2-difenil-1picrilhidrazila (DPPH)

A capacidade sequestradora do radical DPPH da FCN e dos hidrolisados proteicos (HDP e HDT) foi determinada segundo a metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), em total ausência de luz.

Uma alíquota de 15 µL de cada amostra (20 mg/mL) foi adicionada à 1,5 mL do radical DPPH em metanol P.A. (0,06 mmol/L). Os sistemas foram mantidos sob agitação constante durante 30 min, seguida da centrifugação a 14000 rpm. A atividade de sequestro do radical foi verificada a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS, em triplicata. Para curva-padrão foi usada uma solução de trolox (2 mmol/L) cujas concentrações variaram entre 100 µL e 2000 µL. Os resultados foram expressos na forma de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ± desvio padrão, calculados pela equação 4:

$$\mu\text{mol Trolox/mg} = \frac{\mu\text{mol Trolox/mL}}{\text{Casf}} \quad (4)$$

O valor de Casf, concentração da amostra na solução final, é obtido pela equação 5:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \quad (5)$$

O valor de µmol Trolox/mL, concentração pela equação da reta e equivalente à TEAC, é obtido pela equação 6:

$$\mu\text{mol Trolox/mL} = \frac{(\text{DOa} - m)}{n} \quad (6)$$

1000

Onde:

- DOa – Densidade óptica da amostra;
- m – Coeficiente angular da reta da curva padrão;
- n – Coeficiente linear da reta da curva padrão;
- C1 – Concentração inicial da amostra;
- V1 – alíquota da amostra a ser misturada com a solução de radical;
- C2 – Concentração da amostra na solução final;
- V2 – Volume final, após adição da solução de radical à amostra.

3.13.4.2 Atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS

A capacidade sequestradora do radical ABTS da FCN, do HDP e do HDT foi determinada seguindo a metodologia proposta por Re et al. (1999). O radical ABTS foi preparado a partir de uma solução estoque de ABTS (7 mmol/L) e uma solução estoque de persulfato de potássio (140 mmol/L).

Uma alíquota de 30 µL foi adicionada a 1,5 mL da solução de radical ABTS em etanol. Após homogeneização, foi realizada a leitura no tempo zero apenas do controle, contendo radical livre e álcool etílico P.A., e todos os ensaios em triplicata foram mantidos a 25 °C por 6 minutos. Em seguida, a atividade de eliminação do radical de acordo com a capacidade antioxidante dos hidrolisados foi verificada a 734 nm em espectrofotômetro UV-VIS Ultrospec 1100 pro (Amersham, Biosciences). Para curva-padrão foi usada uma solução de trolox (2 mmol/L) cujas concentrações variaram entre 100 µL e 2000 µL.

Os resultados foram expressos na forma de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ± desvio padrão, calculados pelas equações utilizadas no ensaio de DPPH.

3.13.4.3 Capacidade de redução férrica

A capacidade de redução férrica foi avaliada utilizando a metodologia FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), conforme descrita por Rufino et al. (2006), com modificações. O reagente de FRAP foi preparado por mistura de tampão acetato (300 mmol/L – pH 3,6) com uma solução de TPTZ 10 mmol/L (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em HCl 40 mmol/L e 20 mmol / L de FeCl₃ a 10:1:1 (v/v/v). Uma alíquota de 100 µL de cada amostra (20 mg/mL) foi

adicionada a 3,4 mL do reagente FRAP. Após homogeneização, os sistemas, em triplicata, foram mantidos a 37 °C por 30 minutos, sob agitação constante (100 rpm). Em seguida, a atividade de redução do íon férrico (Fe^{3+}) para a forma ferrosa (Fe^{2+}) da FCN e dos hidrolisados foi verificada a 593 nm em espectrofotômetro UV-VIS Ultrospec 1100 pro (Amersham, Biosciences), zerando-se o equipamento com o branco, contendo solvente e reagente FRAP. Foi usada uma curva de calibração preparada com diferentes concentrações de Trolox, que variaram de 100 a 1000 $\mu\text{mol/L}$.

Os resultados foram expressos na forma de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) $\pm$ desvio padrão, calculados pelas equações utilizadas nos ensaios de DPPH e ABTS.

3.13.5 Análise estatística

A análise antibacteriana foi feita em triplicata e os resultados expressos como CIM ($\mu\text{g/mL}$). As médias foram comparadas por meio de ANOVA *one-way*, seguido do teste de Dunnet (*post-hoc*), no *GraphPad Prism* versão 6 para *Windows* (*GraphPad Prism*, La Jolla, CA, EUA). O nível de probabilidade foi assumido como $p < 0,05$.

As médias das TEAC das análises antioxidantes foram comparadas por meio de ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey no programa *Statistic* versão 7.0. O nível de probabilidade foi assumido como $p < 0,05$.

Com relação ao teste antinociceptivo, para avaliar a distribuição das amostras foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os *outliers* foram removidos. Para analisar as associações entre as variáveis, as médias foram comparadas por meio de ANOVA *one-way*. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (valor- $p \geq 0,05$), foi utilizado o pós-teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ($p < 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell. Os resultados foram expressos em médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Todas as análises foram realizadas através do programa SPSS 20.0 para o *Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de probabilidade (valor- p) foi assumido como $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M.; OTTE, J.; DE GOBBA, C.; OSMAN, A.; HAMAD, E. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 91-98, 2017.
- AHMED, N.; MUSTAFA, H. M.; CATRINA, A. I.; ALSTERGREN, P. Impact of Temporomandibular Joint Pain in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation** v. 2013, p. 1-7, 2013.
- AHMED, S. A.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 44, p. 80-88, 2015.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: effect on the quality of dairy products. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 33-40, 2011.
- ALLENTUCK, A. Temporalities of human–livestock relationships in the late prehistory of the southern Levant. **Journal of Social Archaeology**, p. 1-22, 2014.
- ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHIH, M.; CECILIANI, F.; CRISTOBAL, S.; ECKERSALL, P. D.; HOLLUNG, K.; LISACEK, F.; MAZZUCHELLI, G.; MCLAUGHLIN, M.; MILLER, I.; NALLY, J. E.; PLOWMAN, J.; RENAUT, J.; RODRIGUES, P.; RONCADA, P.; STARIC, J.; TURK, R. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2015.
- ANDRÉN, A.; HÖGBERG, M.; JOHANSSON, M. Relation between α S1-casein content and coagulation properties of milk from swedish dairy goats. **The Open Food Science Journal**, v. 9, p. 1-4, 2015.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th ed. Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- ARAÚJO, I. W. F.; CHAVES, H. V.; PACHÊCO, J. M.; VAL, D. R.; VIEIRA, L. V.; SANTOS, R.; FREITAS, R. S.; RIVANOR, R. L.; MONTEIRO, V. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160-167, 2017.
- AWAD, S.; EL-SAYED, M. I.; WAHBA, A.; EL ATTAR, A.; YOUSEF, M. I.; ZEDAN, M. Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1-12, 2016.
- BALLABIO, C.; CHESSA, S.; RIGNANESE, C.; GIGLIOTTI, G.; PAGNACCO, L.; TERRACCIANO, A.; FIOCCHI, A.; RESTANI, P.; CAROLI, A. M. Goat milk allergenicity as a function of α S1-casein genetic polymorphism. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 998-1004, 2011.

BENJELLOUN, B.; ALBERT, F. J.; STREETER, I.; BOYER, F.; COISSAC, E.; STUCKI, S.; BEN-BATI, M.; IBNELBACHYR, M.; CHENTOUJ, M.; BECHCHARI, A.; LEEMPOEL, K.; ALBERTI, A.; ENGELEN, S.; CHIKNI, A.; CLARKE, L.; FLICEK, P.; JOOST, S.; TABERLET, P.; POMPANON, F.; CONSORTIUM, N. Characterizing neutral genomic diversity and selection signatures in indigenous populations of Moroccan goats (*Capra hircus*) using WGS data. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1-14, 2015.

BERRY, S. D.; SHEEHY, P. A.; WILLIAMSON, P.; SHARP, J. A.; MENZIES, K.; LEFEVRE, C.; DIGBY, M.; NICHOLAS, K. R.; WYNN, P. C.; SNELL, R. G. Significance, origin and function of bovine milk proteins: the biological implications of manipulation or modification. In: BOLAND, M.; HARJINDER S.; ABBY, T. (Ed.). **Milk proteins: from expression to food**. Academic Press, 2014, p. 114-122.

BIBI, F. A. Multi-calibrated mitochondrial phylogeny of extant Bovidae (Artiodactyla, Ruminantia) and the importance of the fossil record to systematic. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 166, p. 1-15, 2013.

BIDASOLO, I. B., RAMOS, M., GOMEZ-RUIZ, J. A. In vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 146-152, 2012.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, v. 9, p. 5377-5392, 2015.

BHUTIA, D. Y.; BABU, E.; RAMACHANDRAN, S.; GANAPATHY, V. Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to "Glutamine Addiction": Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs. **American Association for Cancer Research**, v. 1, n. 79, p. 1782-1788, 2015.

BOMFIM, M. A. D.; QUEIROGA, R. C. E.; AGUILA, M. B.; MEDEIROS, M. C.; FISBERG, M.; RODRIGUES, M. T.; SANTOS, M. O.; LANNA, D. P. D. Abordagem multidisciplinar de P, D & I para o desenvolvimento de produto lácteo caprino com alto teor de CLA e alegação de propriedade funcional. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**, v. 40, p. 98-106, 2011.

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.

BRASIL. Congresso. Senado. **Lei nº 11.947, de 16 de junho de 2009**. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica; altera as Leis nºs 10.880, de 9 de junho de 2004, 11.273, de 6 de fevereiro de 2006, 11.507, de 20 de julho de 2007; revoga dispositivos da Medida Provisória nº 2.178-36, de 24 de agosto de 2001, e a Lei nº 8.913, de 12 de julho de 1994; e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007/2010/2009/lei/l11947.htm. Acesso em: 05 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo

Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.: il. – (Série A. Normas e manuais técnicos)

CABRA SELVAGEM. Disponível em <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Cabra-selvagem>>. Acesso em 01 set. 2017.

CÁNOVAS, J. M.; RENTERO, P. Z.; CACHÁ- MARTÍNEZ, A. M.; HERNÁNDEZ, M. L.; ALEMÁN, J. A. Péptidos bioactivos. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 23, n. 5, p. 219-227, 2011.

CAVALLI, S. V.; SILVA, V. S.; CIMINO, C.; MALCATA, F. X.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 997-1003, 2008.

CEBALLOS, S. L.; MORALES, E. R.; ADARVE, G. T.; CASTRO, J. D.; MARTINEZ, L. P.; SAMPELAYO, M. R. S. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 322–329, 2009.

CONTE, F. P; FERRARIS, F. K.; COSTA, T. E. M. M.; PACHECO, P.; SEITO, L. N.; VERRI-JÚNIOR, W. A.; CUNHA, . Q.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G. Effect of Gedunin on Acute Articular Inflammation and Hypernociception in Mice. **Molecules**, v. 20, p. 2636-2657, 2015.

COSTA, R. G.; ALMEIDA, C. C.; PIMENTA FILHO, E. C.; HOLANDA JÚNIOR, E. V.; SANTOS, N. M. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do estado da Paraíba, Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 218, p. 195-205, 2008.

COSTA, M. R.; JIMÉNEZ-FLORES, R; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 507-514, 2009.

COSTA, W. K.; SOUZA, E. L.; BELTRA, E. M.; VASCONCELOS, G. K. V.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; QUEIROGA, R. C. R.; MAGNANI, M. Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. 1-8, 2014.

COURA, C. O.; CHAVES, H. V.; DO VAL, D. R.; VIEIRA, L. V.; SILVEIRA, F. D.; LOPES, F. M. L. S.; GOMES, F. I. F.; FROTA, A. F.; SOUZA, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. **International Journal of Biological Macromolecule**, v. 97, p. 76-84, 2017.

DA FONSECA, C. E. M.; DA SILVA, T. L.; DE OLIVEIRA, C. A. Caprinocultura. **Programa Rio Rural**: manual técnico, 35, 2012. 54 p.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228

DE ZEN, S; SANTOS, M. C; MONTEIRO, C. M. **Evolução da caprino e ovinocultura.** Ativos ovinos e caprinos. Brasília: 2014, Ano 1, ed 1 (Boletim mensal).

2-D ELECTROPHORESIS PRINCIPLES AND METHODS. GE Healthcare, 2010.
Disponível em < https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-2d-electrophoresis.pdf> Acesso em: 01 maio 2017.

DONG, Y.; XIE, M, JIANG, Y.; XIAO, N.; DU, X.; ZHANG, W.; TOSSER-KLOPP, G.; WANG, J.; YANG, S.; LIANG, J.; CHEN, W.; CHEN, J.; ZENG, P.; HOU, Y.; BIAN, C.; PAN, S.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, W.; SERVIN, B.; SAYRE, B.; ZHU, B.; SWEENEY, D.; MOORE, R.; NIE, W.; SHEN, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, G.; LI, J.; FARAUT, T.; WOMACK, J.; ZHANG, Y.; KIJAS, J.; COCKETT, N.; XU, X.; ZHAO, S.; JUN WANG, J.; WANG, W. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 135-141, 2013.

DUGASHVILLI, G.; MENABDE, G.; JANELIDZE, M.; CHICHUA, Z.; AMIRANASHVILLI, I. Temporomandibular joint disorder (review). **Georgian Medical News**, v. 2015, n. 2, p. 17-20, 2013.

EDELSTEIN, S. **Food Science – An Ecological Approach.** Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2014. 554 p.

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.

EL-SALAM, M. H. Application of proteomics to the areas of milk production, processing and quality control—A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 153-166, 2014.

ERIKSEN, E. K.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; ALMAAS, H.; LEA, T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 29-37, 2008.

ESMAEILPOUR, M; REZA EHSANI, M; AMINLARI, M; SHEKARFOROUSH, S; HOSEINI, E. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 599-615, 2016.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; PÉREZ-GALVEZ, R.; GUADIX, E. M.; GUADIX, A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-783, 2013.

ESPESCHIT, C. J. B. Raça Alpina: Algumas considerações. In: FONSECA, J. F.; FERREIRA, M. I. C.; MARINHO, A. C. S.; RODRIGUES, I. M.(Ed.). **IX Workshop sobre produção de caprinos na região da Mata Atlântica**, 9., 2012, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012, p. 23-40.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United States - **FAOSTAT, 2014**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 11 de março de 2017.

FONSECA, E. T.; OLIVEIRA, C. M.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MIGLINO, M. A. Características das papilas o dorso da língua de cabras (*Capra hircus*): estudo por de microscopia eletrônica de varredura e luz. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p. 6773, 2011.

FONSECA, J. F.; BRUSHI, J. H. A Caprinocultura Leiteira no Brasil – Uma Visão Histórica, 2009. Disponível em <http://www.caprileite.com.br/conteudo.php?id_conteudo=172&id_links=4&id_sub_links=26> Acesso em: 25 jun. 2015.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOVE, T.; McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. Dairy chemistry and biochemistry. **Springer International Publishing**, 2 ed., 2015, 584 p.

FREITAS, R. S.; DO VAL, D. R.; FERNANDES, M. E. F.; GOMES, F. I. F.; de LACERDA, J. T. J. G.; SANTIGADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; PINTO, V. P. T.; CRISTINO-FILHO, G.; PEREIRA, K. M. A.; BRITO, G. A. C.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- α and il-1 β suppression. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 313-323, 2016.

GARCÍA, V.; ROVIRA, S.; BOUTOIAL, K.; LÓPEZ, M. B. Improvements in goat milk quality: a review. **Small Ruminant Research**, 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

GOFF, H. D. The dairy Science and Technology eBook. Disponível em <<https://www.uoguelph.ca/foodscience/print/book/export/html/70>> Acesso em: 25 jun. 2015.

GONZÁLEZ, A. G.; RODRÍGUEZ, J. M. P.; RIVERA, J. R. A. **Manual de produccion caprina**. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, SLP. México, 2009, 2008 p.

GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com

GREENE, C. S. Managing patients with temporomandibular disorders: A new “standard of care”. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v. 138, n. 1, p. 3-4, 2010.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essencial oil components on Gram negative bacteria. **Journal of AgriculturalAnd Food Chemistry**, v. 43, p. 3590-3595, 1998.

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

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 2, p. 82-100, 2014.

HOLT, C; CARVER, J. A.; ECROYD, H.; THORN, D. C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6127-6146, 2013.

HSIEH, C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; WEINBORN, V.; BARILE, D.; BELL, J. M. L. N. M. Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: Effects against the 21st Century Disorders. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-16, 2015.

IFEANYI, O. E. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **International Journal of Research in Medical Sciences**, p. 4, n. 2, p.123-133, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2013**. Rio de Janeiro, v. 41, 2013, 108 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2014**. Rio de Janeiro, v. 42, 2014, 36 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2015**. Rio de Janeiro, v. 43, 2015, 47 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2016**. Rio de Janeiro, 2017, 28 p.

JOHANSSON, M.; HÖGBERG, M.; ANDRÉN, A. Relation Between α S1-Casein Content and Coagulation Properties of Milk from Swedish Dairy Goats. **The Open Food Science Journal**, v. 9, p. 1-4, 2015.

KANWAR, J. R.; ROY, K.; PATEL, Y.; ZHOU, S.; SINGH, M. R.; SINGH, D.; NASIR, M.; SEHGAL, R.; SEHGAL, A.; SINGH, R.; GARG, R.; KANWAR, R. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions. **Molecules**, v. 20, p. 9703-9731, 2015.

KHALDI, N.; HOLTON, T. A.; SHIELDS, D. C. Amino acid enrichment and compositional changes among mammalian milk proteins and the resulting nutritional consequences. **Journal of Dairy Science**, n. 97, p. 1248–1258, 2014.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humagenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KUMAR, A; ROUT, P. K.; MOHANTY, B. P. Identification of Milk Protein Polymorphism in Indian Goats by 2D Gel Electrophoresis. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 6, n. 3, p. 1-4, 2013.

KUMAR, H.; YADAV, D.; KUMAR, N.; SETH, R.; GOYAL, A. K. Nutritional and nutraceutical properties of goat milk-A review. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 5, p. 513-518, 2016.

KUSUMANINGTYAS, E.; WIDIASTUTI, R.; KUSUMANINGRUM, H. D.; SUHARTONO, M. T. Antibacterial and Antioxidant Activities of Goat Milk Hydrolysate Generated by *Bacillus Sp.* E.13. **Global Veterinaria**, v. 16, n. 1, p. 105-110, 2016.

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

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1-18, 2017.

LARANCE, M.; LAMOND, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. **Nature**, v.16, p. 269-280, 2015.

LEVY, E.; PUTNOVÁ, L.; ŠTOHL, R.; SVOBODOVÁ, K.; MATOUŠKOVÁ, J.; ROBOVSKÝ, J.; LAMKA, J.; VRTKOVÁ, I.; ERNST, E. Utility of several microsatellite markers for the genetic characterisation of three ex situ populations of threatened caprine taxa (*Capra aegagrus*, *C. cylindricornis* and *C. falconeri*). **Archives of Animal Breeding**, v. 8, p. 365-372, 2015.

LI, Z.; JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; WANG, Y.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 4242-4251, 2013.

LIEPKE, C.; ZUCHT, H. D.; FORSSMANN, W. G.; STÄNDKER, L. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 752, n. 2, p. 369-377, 2001.

LISSEN, M., LOCHNIT, G., ERHARDT, G. In vitro gastrointestinal digestion of bovine α S1- and α S2-casein variants gives rise to different IgE-binding epitopes. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 47-55, 2014.

LÓPEZ, J. L.; MARINA, A.; VÁZQUEZ, J.; ALVAREZ, G. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. **Marine biology**, v.141, n. 2, p. 217-223, 2002.

MACHADO, T. M. M. História das raças caprinas no Brasil. In: FONSECA, J. F.; BRUCHI, J. H.; MARINHO, A., C., S.; RODRIGUES, I. M. (Ed.). **Produção de caprinos e ovinos de leite**, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Sobral: Embrapa Caprinos, 2011. p. 27-74.

MACHADO, T. M. M.; CHAKIR, C.; LAUVERGNE, J. J. Genetic distances and taxonomic trees between goats of Ceará State (Brazil) and goats of the Mediterranean region (Europe and Africa). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 121-125, 2000.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S.; ABUSHELAIBI, A.; ALAM, A. Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood:

A Detailed Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, 2014.

MAGDELDIN, S.; ENANY, S.; YOSHIDA, Y.; XU, B.; ZHANG, Y.; ZUREENA, Z.; LOKAMANI, I.; YAOITA, E.; YAMAMOTO, T. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. **Clinical Proteomics**, v. 11, n. 16, p. 1-10, 2014.

MAO, X.-Y.; CHENG, X.; WANG, X.; WU, S. J. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 484-490, 2011.

MARKHOR. Disponível em <<https://animalcorner.co.uk/animals/markhor/>>. Acesso em: 01 set. 2017.

MARLETTA, D.; CRISCIONE, A.; BORDONARO, S.; GUASTELLA, A. M.; D'URSO, G. Casein polymorphism in goat's milk. **Lait**, v. 87, p. 491–504, 2007.

MATHIAS, J.; NOZNICA, C. F. Cabras. **Globo Rural**. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1477249-4530-2,00.html>> Acesso em 5 set. 2015.

MEOKAREM, M. M.; JÚNIOR, H. B. Caprinocultura, 2000. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/doc%5Csite%5Cserevicoseprodutos%5Clivraria%5CCaprinocultura%5CCaprinocultura.pdf>> Acesso em 05 de set 2015.

MONFORTE, M. T.; FIMIANI, V.; LANUZZA, F.; NACCARI, C.; RESTUCCIA, S.; GALATI, E. M. *Feijoa sellowiana* Berg fruit juice: anti-Inflammatory effect and activity on superoxide anion generation. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 4, p. 455-461, 2014.

MONTALBANO, M.; TORTORICI, L.; MASTRANGELO, S.; SARDINA, M. T.; PORTOLANO, B. Development and validation of RP-HPLC method for the quantitative estimation of α_{s1} -genetic variants in goat milk. **Food chemistry**, v. 156, p. 165-169, 2014.

MOHANTY, D. P.; MOHAPATRA, S.; MISRA, S.; SAHU, P. S. Milk derived bioactives peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.1-7, 2015.

MORGAN, P.; TREWEEK, T. M; LINDNER, R. A.; PRICE, H. E.; CARVER, J. A. Casein Proteins as Molecular Chaperones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2670-2683, 2005.

MUEHLHOFF, E.; ANTHONY, B.; DEIRDRE, M. (Org.) **Milk and dairy products in human nutrition**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT), 2013.

NCCLA – National Comite for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - 6th ed. NCCLS document M7 – A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. **Biochemical Journal**, 473, p. 4527–4550, 2016.

NOMURA, K.; YONEZAWA, T.; MANO, S.; KAWAKAMI, S.; SHEDLOCK, A. M.; HASEGAWA, M.; AMANO, T. Domestication process of the goat revealed by an analysis of the nearly complete mitochondrial protein-encoding genes. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. 1-15, 2013.

NOORDHOUT, C. M.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ANGULO, F. J.; VERBEKE, G.; HAAGSMA, J.; KIRK, M.; HAVELAAR, A.; SPEYBROECK, N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, 2014.

NORRIS, J. L.; CAPRIOLI, R. M. Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2309-2342, 2013.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, B. M.; COORSSSEN, J. R.; MARTINS-DE-SOUZA, D. 2DE: The Phoenix of Proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 104, p. 140-150, 2014.

O'RIORDAN, N.; KANE, M.; JOSHI, L.; RICKEY, R. M. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. **Oxford Journals**, v. 24, n. 3, p. 220-236, 2014.

ORTEA, I.; O'CONNOR, G.; MAQUET, A. Review on proteomics for food authentication. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 212-225, 2016.

PALATNIK, D. R.; PORCEL, M. V. O.; GONZÁLEZ, U.; ZARITZKY, N.; CAMPDERRÓS, M. E. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 331-338, 2015.

PATIL, P.; MANDAL, S.; TOMAR, S. K.; ANAND, S. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. **European Journal of Nutrition**, v. 54, p. 863-880, 2015.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules**, v. 20, p. 5286-5298, 2015.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. **Proteomics: from protein sequence to function**. New York: Springer-Verlag e BIOS Scientific Plubishers, v. 1, 2001.

PEPE, G.; TENORE, G. C.; MASTROCINQUE, R.; STUSIO, P.; CAMPIGLIA, P. Potential anticarcinogenic peptides from bovine milk. **Journal of Amino Acids**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900713004607#>. Acesso em: 10 jan. 2014.

PESQUISA da pecuária municipal. In: IBGE. **Sidra**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=22>

PHELAN, M.; AHERNE-BRUCE, S. A.; O'SULLIVAN, D.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 5, p. 279-285, 2009.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PORTER, V. Mason's World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties. **CABI Publishing**, 5 ed., 2002, 400 p.

QUIRÓS, A.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; AMIGO, L.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3480-3487, 2005.

RIVANOR, R. L. C.; CHAVES, H. V.; do VAL, D. R.; de FREITAS, A. R.; LEMOS, J. C. L.; RODRIGUES, J. A. G.; PEREIRA, K. M. A.; de ARAÚJO, I. W. F.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, p. 34-43, 2014.

RAFIQ, S.; HUMA, N.; PASHA, I.; SAMEEN, A.; MUKHTAR1, O.; KHAN, M. I. Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 7, p. 1022-1028, 2016.

ROCHA, T. L.; da COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; de VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; da SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas, p. 1-12, 2005.

RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZI, L. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n.14, p.4259-4274, 2012.

RONQUILLO, M. B. M. R. Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. 2012. 65 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidad Autónoma Metropolitana, México, Distrito Federal.

ROSLAND, J. H., 1991. The formalin test in mice: The influence of ambient temperature. **Pain**, v. 45, p. 211-216, 1991.

ROVERONI, R. C., PARADA, C. A., CECÍLIA, M., VEIGA, F. A., TAMBELI, C.H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. **Pain**, v. 94, 2001.

ROY, S.; KUMAR, V. A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 8, p. 955-960, 2014.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D.. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

SALAMI, M.; YOUSEFI, R.; EHSANI, M. R.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T.; RAZAVI, S. H.; SABOURY, A. A.; NIASARI-NASLAJI, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1097-1102, 2008

SALEM, S. A.; EL-AGAMY, E. I.; SALAMA, F.; ABOSOLIMAN, N. H. Isolation, molecular and biochemical characterization of goat milk casein and its fractions. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 11, p. 29-35, 2009.

SALQUE, M.; BOGUCKI, P. I.; PYZEL, J.; SOBKOWIAK-TABAKA, I.; GRYGIEL, R.; SZMYT, M.; EVERSLED, R. P. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. **Nature**, v. 493, p. 522-525, 2013.

SANTILLO, A.; KELLY, A. L.; PALERMO, C.; SEVI, A.; ALBENZIO, M. Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 655-660, 2009.

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**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practices**. 3ed. New York: Springer erlag, 1994. 380p. (Spring advanced texts in chemistry).

SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; DARIO, C.; TUFARELLI, V. Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 1035-1048, 2014.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHARP, A. J.; WATT, A.; BISANA, S.; MODEPALLI, V.; WANYONYI, S.; KUMAR, A.; KWEK, J.; COLLINS, R.; LEFÈVRE, C.; NICHOLAS, K. R. The comparative genomics of Monotremes, Marsupials and Pinnipeds: Models to examine the functions of milk proteins. In: BOLAND, M.; HARJINDER, S.; ABBY, T. (Ed.). **Milk proteins: from expression to food**. Academic Press, 2014, p. 75-88.

SINGH, R. K. Temporomandibular joint disorders. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 29, 2016.

SILANIKOVE, N.; MERIN, U.; LEITNER, G. On effects of subclinical mastitis and stage of lactation on milk quality in goats. **Small Ruminant Research**, v. 122, n. 1, p. 76-82, 2014.

SILVA, E. M. N.; DE SOUZA, B. B.; SILVA, G. A.; DE AZEVEDO, S. S.; MARQUES, B. A. A.; GOMES, T. L. S. Diagnóstico dos sistemas de produção de leite de cabra no município de Sumé, cariri da Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 2, p. 61-65, 2013.

SILVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. N.; SILVA, L. C. B. B.; FORTES, D. T. O.; LIMA, T. A.; ZINGALI, R. B.; PONTUAL, E. V.; ARAÚJO, J. M.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, C. G.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, p. 1-8, 2016.

SKALNIKOVA, H. K. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. **Biochimie**, p. 1-16, 2013.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, v. 12, p. 1412-1416, 1967.

SRUTHI, G. Role of antioxidants in the management of diabetes mellitus. **International Journal Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 10, n. 4, 2017.

STOJILJKOVIĆ, D.; ARSIĆ, I.; TADIĆ. Oil extracts of wild apple fruit as active substances in UV protection preparations. **Radiation and Applications**, v. 1, n. 3, p. 187-190, 2016.

STATSOFT, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7.

STEWART, A. F.; BONSING, J.; BEATTIE, C. W.; SHAH, F.; WILLIS, I. M.; MACKINLAY, A. G. Complete Nucleotide Sequences of Bovine α s2- and β -Casein cDNAs: Comparisons with Related Sequences in Other Species. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n. 3, p. 231-241, 1987.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. Staphylococcus aureus. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2017.

THURSTON, G.; SURI, C.; SMITH, K.; MCCLAIN, J.; SATO, T. N. YANCOPOULOS, G. D.; MCDONALD, D. M. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. **Science**, v. 286, 1999.

TIDONA, F.; SEKSE, C.; CRISCIONE, A.; JACOBSEN, M.; BORDONARO, S.; MARLETTA, D.; VEGARUD, G. E. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 158-165, 2011.

TREWEEK, T. Alpha-casein as a molecular chaperone. In W. L. HURLEY (Ed.). **Milk Protein**, Rijeka, Croatia: InTech, 2012, p. 85-119.

TONG, S. Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

VOM BAUM, H.; MARRE, H. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implication. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 503-511, 2005.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *E. coli*. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>> Acesso em: 29 dez. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Salmonella*. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/> Acesso em: 29 dez. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Strengthening surveillance of and response to foodborne diseases: a practical manual. Stage 1. Investigating foodborne disease outbreaks**, 2017. 96 p. ISBN 978-92-4-151323-4. Disponível em <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259475/1/9789241513234-eng.pdf?ua=1>> Acesso em: 29 dez. 2017.

WU, G.; BAZER, F. W.; DAI, Z.; LI, D.; WANG, J.; WU, Z. Amino Acid Nutrition in Animals: Protein Synthesis and Beyond. **The Annual Review of Animal Biosciences**, 2014.

WU, J.; DOMELLÖF, M.; ZIVKOVIC, A. M.; LARSSON, G.; ÖHMAN, A.; NORDING, M. L.. NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 469, n. 3, p. 626-632, 2016.

XU, M.; WANG, Y.; DAI, Z.; ZHANG, Y.; LI, Y.; WANG, J. Comparison of growth and nutritional status in infants receiving goat milk-based formula and cow milk-based formula: a randomized, double-blind study. **Food & Nutrition Research**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 2015.

YAMAUCHI, R.; OHINATA, K.; YOSHIKAWA, M. Beta-lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT2 receptor. **Peptides**, v. 24, n. 12, p. 1955-1961, 2003.

ZHANG, J.; XIN, L.; SHAN, B.; CHEN, W.; XIE, M.; YUEN, D.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; LAJOIE, G. A.; MA, B. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1-8, 2012.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese estão apresentados em forma de Artigos Científicos submetidos em periódicos de impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, e depósito de patentes.

Artigo 1: “Comparative proteomic profiling of goat milk casein fractions over lactation”, submetido à revista “The Journal of Nutritional Biochemistry”;

Artigo 2: “Proteomic and potentialities of proteins and peptides of casein fraction of goat milk”, submetido à revista “Food Chemistry”

Patente 1: “Precipitado proteico de leite caprino como agente antinociceptivo e uso analgésico”;

Patente 2: “Hidrolisado da fração caseínica de leite caprino como agente antimicrobiano”

Patente 3: “Obtenção de hidrolisado de fração caseínica e seu uso como agente antimicrobiano para infecções provocadas por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* e *Escherichia coli*”.

4.1 ARTIGO 1: COMPARATIVE PROTEOMIC PROFILING OF GOAT MILK CASEIN FRACTIONS OVER LACTATION

Paula Perazzo de Souza Barbosa^a, José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda^b, Giuseppe Gianini Figueiredo Leite^b, Maria Aparecida Juliano^c, Meriellen Dias^d, Maria Anita Mendes^d, Carlos Alberto de Almeida Gadelha^e, Tatiane Santi Gadelha^{e*}

^aPostgraduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^bFederal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^cDepartment of Biophysics, Paulista Medical School, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^dLSCP – Chemical Engineering Department, University of São Paulo (USP), Brazil

^eDepartment of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

*Corresponding author

Postal address: DBM, CCEN, UFPB, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, 58051-085, João Pessoa - PB.

Telephone number:

E-mail address: santi.tatiane@gmail.com

Abstract

Milk is a fluid produced by mammary glands to feed the mammal offspring at birth. As few studies had contemplated the biochemistry analysis of goat milk casein fractions, this study reports a identification comparative through nLC-ESI-MS/MS analysis of casein fractions proteins over lactation and its phosphorylation and variants patterns of the goats milk from Northeast of Brazil. A total of 106 distinct proteins in the casein fractions were identified. Of these, 40 proteins were common in all caseins fractions, while 17, 13 and 14 proteins were unique of colostrum, lactation peak and mature milk, respectively. Through of protein-protein interaction analysis performed by conserved proteins over lactation, 36 making a set of 49 interactions majority related to defense and response to stimulus. Additionally, it was mapped 30 phosphorylation and 04 variant sites, in which case the Thr27 from β -casein and Ser55 from α -s2-casein were identified as phosphoresidues that weren't reported in literature. In conclusion, the protein profiling changes according to nutritional requirement over puppy development. Furthermore, some proteins found may to expose new biotechnology approaches as an potential bioactive anticancer and these novel identified phosphorylation sites also may contribute to understanding of the influence these modification on allergenicity of goat milk.

Keywords: Protein changes; Mass spectrometry; Phosphorylation

1 Introduction

Milk is a biological fluid produced by mammary glands^[1] in order to feed the mammal offspring at birth^[2]. This food is a complex of substances and its proteins perform a variety of functions besides their primary role as source of amino acids for newborns^[3]. The domestic goat (*Capra hircus*) arose probably about 10,000 years ago in the region of the Fertile Crescent and it is created in several parts of the globe, being an important source of diverse products^[4]. Goat milk is consumed until today in many places of the world, including in Brazil.

The Brazilian Northeast concentrates 93.0% of the national herd, equivalent to 9.09 million of animals and their production has been of great socioeconomic^[5]. However, dairy goat breeding in Brazil is still not very expressive and it has low economic potential limiting its use, although goat milk has excellent biological value and characteristics which arouse the interest of the dairy industry, such as exclusive flavor and aroma^[6]. Indeed, there are few studies that contemplate the detailed biochemistry analysis of goat milk, in special concerning casein fraction composition when compared to bovine and human milks.

Casein is the main fraction of ruminant milk and one of its most interesting components due to nutritional value^[7]. The caseins α s1-casein, α s2-casein, β -casein, and κ -casein, calcium and phosphate are the major components of casein–calcium–transport complexes or casein micelles^[8] and it plays a role in milk synthesis, stability, and secretion, as well as prevents the formation of amyloid fibrils in the mammary gland^[8;9]. Although these proteins are the major protein constituents of the ultrastructure micellar and others micelle-associated proteins also may be involved on functional characteristics^[10], the understanding about profile protein changes over lactation is still poorly elucidated.

Proteomics techniques has been used as expressive tools in food science during the various stages of food production for reveal proteins that can act as indicators for properties associated with quality, composition or origin of foods^[11]. In present study was made a comparative proteomic analysis of the milk from casein fractions and its phosphorylation and variants sites of the goats from Northeast region of Brazil, collected in different lactation time.

2 Material and methods

2.1 Sample preparation and collection

Goat milk samples were obtained from the Caprine Sector of the Center for Human, Social and Agrarian Sciences (CCHSA – Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias) of the Federal University of Paraíba (UFPB – Universidade Federal da Paraíba), Câmpus III, Bananeiras municipality / PB, at 3 post-partum intervals: 4 ± 2 ; 28 ± 2 and 120 ± 2 days of the lactation period colostrum, lactation peak and mature milk, respectively. In order to obtain goat milk proteins, the samples from each laction time were skimmed by centrifugation ($4856 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min – NT 815 Novatecnic) and subjected to isoelectric precipitation with hydrochloric acid (HCl) until reaching pH 4.1, resulting insoluble fraction (serum) and in the precipitate (casein fraction).

The precipitate was washed three times with distilled water ($4856 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min – NT 815 Novatecnic), solubilized with sodium hydroxide (NaOH) and determined the soluble protein content. It was then dialysed against distilled water on cellulose membrane (cut-off 14 kDa), frozen at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and lyophilized (model Liotop L101) for further analysis.

2.2 Mass spectrometry analysis

After protein quantification by Bradford method^[12], 300 μg of proteins of each sample were solubilized in 50 mM NH_4HCO_3 (pH 7.8) to obtain a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The solution was incubated for 5 min at $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ to achieve thermal denaturation, followed by reduction with 5 mM DTT (final concentration) for 30 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and alkylation with iodoacetamide at a final concentration of 15 mM for 90 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark. Sequencing grade mix Trypsin/LysC (Promega Corporation) was added at a ratio of 1:75 (enzyme/substrate) and the solution was incubated for 16 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The samples were concentrated in a vacuum concentrator at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and kept frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

The peptide mixtures were resuspended in a 2% acetonitrile/0.1% formic acid solution and subjected to nLC-ESI-MS/MS analysis performed on a Dionex Ultimate 3000 NanoLC System (Thermo Fisher Scientific) coupled with an Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics). Peptides were trapped on a μ -precolumn pepMap100 (C18 column, 300 μm id $\times$ 5 mm length, 5 μm particle size, 100 $\text{\AA}$ pore size; Dionex, Thermo Fisher Scientific) and separated online using Acclaim Pepmap RSLC analytical column (Dionex-C18, 100 $\text{\AA}$, 75 $\mu\text{m} \times 15\text{ cm}$) under gradient elution from 2 to 98% (v/v) of acetonitrile 0.1% FA during 180 min and flow rate set to 300 nL/min. Mass Spectra were acquired in the positive-ion mode with MS precursors and MS/MS products acquired at 2 Hz in the 50-3000 m/z mass

range and ramped collision-induced dissociation (CID) energy parameters ranged from 7 to 70 eV.

2.3 Database searches

The raw MS data files (.d file) containing MS/MS spectra were imported in PEAKS Studio 8.5 software (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, Canada) for de novo analysis and database searches (Zhang et al., 2012). De novo analysis was carried out with precursor mass tolerance of 10 ppm, fragment mass tolerance of 0.025 Da, trypsin as specific enzyme and maximum of two missed cleavage, carbamidomethylation of Cys (+57.02 Da) was set as fixed modification along with oxidation of Met (+15.99 Da) and phosphorylation in Ser, Thr and Tyr (+79.97 Da) as variable modifications. Since goat have few protein sequences in reviewed database, de novo sequenced peptides with average local confidence (ALC) scores $\geq 50\%$ were selected and submitted to database searches using SPIDER tools against the *Capra hircus* database from UniprotKB (2828 sequences, downloaded in August 10th, 2017 from <http://www.uniprot.org/>) in first round and against the Ruminantia database from Uniprot/Swiss-prot (7116 sequences, downloaded in August 20th, 2017 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) in second round. The false discovery rates (FDRs) for protein and peptides were set at a maximum of 1%. Protein identification required at least 01 unique peptide with five *b*- or *y*- ions matches and 02 peptide-spectrum matches (PSM).

2.4 Bioinformatics analyse

The protein-protein interaction (PPI) network was constructed between proteins identified in common in different stages of lactation using the STRING database v. 10.5^[13]. Were used PPIs confirmed by experimental study, curated databases and text mining against *Bos taurus* as background-organism^[10]. Proteins with more interactions (high degree) were selected as key nodes. In order to categorize the common proteins in Gene Ontology (GO) terms, PANTHER overrepresentation test was used to search the data against the PANTHER database (PANTHER v. 13.1 Released 2018-02-03)^[14], to identify biological process overrepresented in our data compared to a reference *Bos taurus*. P-values were adjusted using a Fisher's Exact with false discovery rate (FDR) multiple test correction, a p-value cut-off <0.01 and FDR <0.05 as used.

3 Results and discussion

3.1 Identification of proteins in casein fractions from the different maturation stages

Based in nLC-ESI-MS/MS analysis were identified 106 proteins in caseins fractions from the 03 lactation stages across multi-databases analysis (Table S1). Of these, 40 proteins were commonly identified in all caseins fractions while 17, 13 and 14 proteins were unique to colostrum, lactation peak and mature milk samples, respectively. Although the most proteins were conserved, through of overlap it was possible to describe a more relationship between lactation peak and mature milk, and it also to report processes changes over maturation according to GO terms from Panther DB, like increase of metabolic process, response to stimulus and biologic regulation; decreasing of development, multicellular and immunity system processes and biologic adhesion (Fig. 1).

Recently, a previous study reported which the exosome from bovine colostrum show a composition enriched with proteins involved in immune response and growth, as well as adhesion proteins and others regulating blood coagulation indicating the distinguished role of colostrum on the innate immune system of the infant^[15]. In a quantitative analysis, the decreasing of proteins linked to immunity system during the course of lactation was associated with to rapid reaction against large groups of pathogens in the gastrointestinal tract in early lactation, whereas transport protein and enzymes higher due to lipid and protein metabolic regulations^[16]. The changes on group of proteins also were observed in human milk proteome, which show an increase related to energy metabolism on late lactation^[17].

When examining the particularly of each fraction according to GO, the 17 unique proteins from colostrum were mainly related to skeletal muscle regulation by negative (ID3, TNF and MSTN) and positive (Myf5) acting factors of myoblast differentiation, and heparin binding (MSTN, APOE, LTBP2, FN1). The MSTN, known also as GFDF8, is a member of the transforming growth factor (TGF)- β family that negatively regulates muscle mass and bone regeneration^[18; 19], but also to remodel skeletal muscles which is necessary for muscle adaptation^[20], promote the growth and development human intestine^[21] and body fat accumulation^[22]. The TNF act on simulating muscle gene expression during the early stage of differentiation and muscle protein degradation during the late stage of differentiation and to influence the ACTA1 expression^[23], found only in colostrum casein fraction.

Others proteins identified in early lactation involved in the blood coagulation cascade and stimulating cell proliferation may be associated with some development and immunity

processes like intestinal permeability and modulation of tolerance/immune response balance (Haptoglobin)^[24], leukocyte recruitment to inflamed endothelium and decreasing of air way inflammation (Alpha-2-macroglobulin)^[25; 26], craniofacial and uterine development (Cadherin-1)^[27; 28] and iron-transport/antibacterial activity (Serotransferrin)^[29], which possibility act to facilitate greater iron absorption by the epithelial cells of premature intestine.

The proteins found in casein fractions from late lactation were related to structural requirement. Of the unique found in lactation peak, the keratin cytoskeletal proteins family and Collagen alpha-2(XI) chain correspond to structural molecule activity by the GO analysis. Moreover, other extracellular matrix proteins as Biglycan (BGN) and Connective tissue growth factor (CTGF) were involved to skeletal muscle regeneration during muscle growth and differentiation of myoblasts in dystrophic muscle, respectively, and also were reported in inflammation processes^[30; 31; 32]. Thus, these proteins suggest a goat mammary gland inflammation marked by the keratinization and muscle fortification need for development of goatling.

In mature milk, the 14 protein unique were associated with regulation of microtubule nucleation (HSPA1A and HSPA1B) and protein folding (ERP29, PDIA4, HSPA1A and HSPA1B). In addition to structural functions, other proteins were related to response to stimulus corresponding to potential agents against pathogens and innate immune molecules like Vimentin^[33], Lactoperoxidase^[34; 35], Cysteine-rich secretory protein 3^[36], Interferon gamma^[37] and Lipocalin family of allergens (Allergen Bos d2)^[38].

3.2 Functional enrichment and network analysis of the conserved proteins in the all lactation stages

From 40 identified proteins in the 03 lactation stages, it was described a PPI network of 36 nodes making a set of 49 interactions, once that 04 proteins were present as fragments and so no showing annotations. The Serum albumin (ALB), Alpha-Lactalbumin (LALBA), Beta-casein (CSN2) and Beta-lactoglobulin (LGB or PAEP) had most interactions (degree > 5). The ALB one of major whey proteins is related to cellular protection against mutagenic chemical compounds^[39] and immune defense reactions in the infected glands^[40; 41]; LALBA and CSN2 may be related to the immunological function^[42; 43] and the LGB has be characterized by antioxidant nature in bovine milk^[44]. Although they share functions like response to stimulus and defense, these key nodes interact with other proteins which are more notably reported with this characteristic, i.e., C9, C3, CATHL1 and B2M (Fig. 2).

In addition, we found two proteins (H4 and KANSL2) that have function of transcription regulation, although it don't show interaction in our network, the KANSL2 is directly involved in the acetylation of histone H4 on lysine residues^[45]. Its process is may be involved in mammary gland development and milk production^[46], as well as H4 was also reported with antimicrobial functions^[47]. Another process found that is related to protein metabolism is endoplasmic reticulum-associated degradation, which was found two proteins involved in our network (OS9 and VCP), these proteins are associated in the monitoring of the quality of secreted proteins^[48].

According to functional enrichment, high proportions of the proteins are related with response to stimulus and defense, as well as lipid/cholesterol and lactose metabolism. The proteins associated with to stimulus response is more related to hormones (dehydroepiandrosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone and estradiol) that are playing a fundamental role in the development of mammary glands and highly important in lactogenesis^[49; 50]. Defense process also found in other ruminants – cell killing, response to bacterium, humoral immune response, complement activation and regulation of immune response – are extremely important process in development ensuring healthy growth and also protection of the mammary gland throughout lactation^[10; 51; 52; 53].

Other processes enriched, its related to lactose metabolism, calcium homeostasis, lipids/cholesterol absorption, transport and homeostasis. LALBA and beta-1,4-galactosyltransferase I (B4GALT1) are essential for lactose processes and encodes in different stages of lactation^[54]. The lipids/cholesterol absorption and transport processes (APOA4, APOA1, LPL, MTTP and C3) may be related with early ruminants gastrointestinal system is not fully developed after birth^[55; 56], and its maturation is influenced through of the milk ingestion^[56], therefore, these proteins help in nutrition during all maturation period.

3.3 Mapping of variants and phosphorylation sites in proteins from goat milk casein fractions

The caseins and osteopontin were major proteins that shown multiples potential phosphorylation sites, such have previously been reported^[57], but the higher number of residues featured low-intensity ion that decrease the detection efficiency based on phosphate group negatively charged affecting the ionization of the phosphorylated peptides^[58]. To determine the specific sites of phosphorylation and mutation within them with better accuracy, the modifications were considered with a minimal ion intensity of 5% or AScore $\geq$

20 followed by spectral validation, in which the phosphorylation sites were indicative from neutral loss of phosphoric acid ($-\text{H}_3\text{PO}_4$) corresponding to y_n-98 and/or b_n-98 ions.

As a representative example of how it were assigned and validated specific phosphorylation sites, 29 peptides coverage from osteopontin (Uniprot id A9YUB7) has labeled phosphorylation, but only 03 residues shown confident ion score following the parameters established. After manual spectral validation, the phosphoserine 255 detected from the peptide $\text{LDLDHKS}^{255}\text{EEDKR}$ (residue 51 – 61) at m/z 782.85^{+2} was the unique modification observed with accuracy due to MS/MS spectrum exhibit a clear neutral loss of 98 Da observed in y_6 fragment ion (Fig. 3). Since the osteopontin has been reported as a multi-phosphorylated protein, other potential sites were not considered due to low-intensity ion.

With this analysis, we mapped 30 phosphorylation and 04 variant sites (Table 1). Of these, two phosphorylation sites found in α -s2-casein (Ser55) and β -casein (Thr27) were not included in Uniprot database description or reported in literature. The novel phosphorylation site found in α -s2-casein was identified through of monophosphorylated peptide $\text{LC}^{(+57.02)}\text{TTS}^{55}\text{C}^{(+57.02)}\text{EEVVR}$ at m/z 1433.57^{+1} and 717.29^{+2} (y_7-98) with a total of 352 peptide-spectrum matches (PSM) and AScore of 26.02. So, we reported Ser55 as correct phosphorylated residue based on number of PSMs having precursor ion single and doubly charged and through of peptide sequence $\text{TTS}^{55}\text{C}^{(+57.02)}\text{EEVVR}$ (residue 53 – 61) at m/z 580.73^{+2} that make confident the localization of the modification (Fig. 4).

The phosphoserine 50 from β -casein has been no described in database, but it was demonstrated in previous study^[59] and may be found in others ruminants species. The identification of phosphothreonine 27 in β -casein was obtained from tetra-phosphopeptide $\text{REQEELNVVGET}^{27}\text{VES}^{30}\text{LS}^{32}\text{S}^{33}\text{S}^{34}\text{EESITHINK}$ at m/z 1181.79^{+3} ($M = 3542.35$ Da) consisting of 04 neutral loss (-98 Da) with 111 PSM. Despite of tryptic peptide has 05 possible sites of phosphorylation, the Ser34 no contained a fragment ion corresponding to neutral loss, while Thr27 shown $b_{12}(-98)$ ion with AScore of 25.74, in which indicated its phosphorylation (Fig. 5). In addition, Thr27 also was identified as phosphorylated residue in β -casein from sheep (Uniprot id P11839), being the more likely site according to similarity cross-species.

4 Conclusion

The proteins profiling changes performed in lactation over time occurred according to nutritional requirement. Despite most studies shown just quantitative differences over time, the proteins identified in only a few casein fractions may be due to the low concentration of these proteins in each stage, which promoted variations in micelles contents. This qualitative differentiation featured enables to distinguish these fractions through of proteins and functions co-regulated. Furthermore, some proteins found, mainly in mature milk casein fraction, may to expose new biotechnology approaches for casein fractions as an potential biologically active anticancer^[60], similar to demonstrated by goat milk whey^[61]. In parallel, the novel identified phosphorylation sites also may contribute to understanding of the influence these PTMs on immunoreactivity of IgE epitopes affecting allergenicity from goat milk^[62].

Aknowledgments: The authors thank to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for finance the work, and Professor George Rodrigo Beltrão da Cruz, then head of the Caprine Sector of the câmpus III of the UFPB, Bananeiras / PB, for making available the milk samples used here.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Author contributions: Paula Perazzo de Souza Barbosa, Carlos Alberto de Almeida Gadelha and Tatiane Santi Gadelha: elaboration of the article, getting and partial characterization of the proteins; José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda, Giuseppe Gianini Figueiredo Leite, Maria Aparecida Juliano, Meriellen Dias, Maria Anita Mendes: nLC-ESI-MS/MS analysis and elaboration of the article.

References

- [1] Yang Y, Bu D, Zhao X *et al.* (2013) Proteomic Analysis of Cow, Yak, Buffalo, Goat and Camel Milk Whey Proteins: Quantitative Differential Expression Patterns. *Journal of Proteome Research* **12**, 1660-1667.

- [2] Khaldi N, Holton TA, Shields DC (2014) Amino acid enrichment and compositional changes among mammalian milk proteins and the resulting nutritional consequences. *Journal of Dairy Science* **97**, 1248-1258.
- [3] Beck KL, Weber D, Phinney BS *et al.* (2015) Comparative Proteomics of Human and Macaque Milk Reveals Species-Specific Nutrition during Postnatal Development. *Journal of Proteome Research* **14**, 2143-2157.
- [4] Dong Y, Xie M, Jiang Y *et al.* (2012) Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nature Biotechnology* **31**, 135.
- [5] IBGE (2016) Produção da pecuária municipal, vol. 44, pp. 1-54.
- [6] Vogado GMS, Fonseca WJL, Evangelista AF *et al.* (2017) EVALUATION OF THE MILK PRODUCTION OF SAANEN GOATS IN BRAZIL. *Nucleus* **14**, 153-160.
- [7] Kumar A, Rout P, Mohanty B (2012) Identification of milk protein polymorphism in Indian goats by 2D gel electrophoresis. *J Proteomics Bioinform* **6**, 1-4.
- [8] Farrell HM, Malin EL, Brown EM *et al.* (2006) Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 135-147.
- [9] Holt C, Carver JA, Ecroyd H *et al.* (2013) Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of dairy science* **96**, 6127-6146.
- [10] Wang X, Zhao X, Huang D *et al.* (2017) Proteomic analysis and cross species comparison of casein fractions from the milk of dairy animals. *Sci Rep* **7**, 43020.
- [11] Ortea I, O'Connor G, Maquet A (2016) Review on proteomics for food authentication. *Journal of proteomics* **147**, 212-225.
- [12] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- [13] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H *et al.* (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research* **45**, D362-D368.
- [14] Mi H, Poudel S, Muruganujan A *et al.* (2016) PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Research* **44**, D336-D342.
- [15] Samuel M, Chisanga D, Liem M *et al.* (2017) Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Scientific Reports* **7**, 5933.

- [16] Zhang L, van Dijk ADJ, Hettinga K (2016) An interactomics overview of the human and bovine milk proteome over lactation. *Proteome Science* **15**, 1.
- [17] Zhang L, de Waard M, Verheijen H *et al.* (2016) Changes over lactation in breast milk serum proteins involved in the maturation of immune and digestive system of the infant. *Journal of Proteomics* **147**, 40-47.
- [18] Wallner C, Jaurich H, Wagner JM *et al.* (2017) Inhibition of GDF8 (Myostatin) accelerates bone regeneration in diabetes mellitus type 2. *Scientific Reports* **7**, 9878.
- [19] Langley B, Thomas M, Bishop A *et al.* (2002) Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49831-49840.
- [20] Kostyunina DS, Ivanova AD, Smirnova OV (2018) Myostatin: Twenty Years Later. *Human Physiology* **44**, 88-101.
- [21] Purup S, Vestergaard M, O Pedersen L *et al.* (2006) Biological activity of bovine milk on proliferation of human intestinal cells. *Journal of Dairy Research* **74**, 58-65.
- [22] Deng B, Zhang F, Wen J *et al.* (2017) The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutrition & Metabolism* **14**, 29.
- [23] Li Y-P, Schwartz RJ (2001) TNF- α regulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion. *The FASEB Journal* **15**, 1413-1415.
- [24] Fasano A (2011) Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiological Reviews* **91**, 151-175.
- [25] Canova DF, Pavlov AM, Norling LV *et al.* (2015) Alpha-2-macroglobulin loaded microcapsules enhance human leukocyte functions and innate immune response. *Journal of Controlled Release* **217**, 284-292.
- [26] Bazan-Socha S, Mastalerz L, Cybulska A *et al.* (2017) Impaired fibrinolysis and lower levels of plasma α 2-macroglobulin are associated with an increased risk of severe asthma exacerbations. *Scientific Reports* **7**, 11014.
- [27] Shao R, Liu J, Yan G *et al.* (2016) Cdh1 regulates craniofacial development via APC-dependent ubiquitination and activation of Goosecoid. *Cell Research* **26**, 699.
- [28] Reardon SN, King ML, MacLean JA *et al.* (2012) Cdh1 Is Essential for Endometrial Differentiation, Gland Development, and Adult Function in the Mouse Uterus. *Biology of Reproduction* **86**, 141.
- [29] Zhou Z, Xu M-J, Gao B (2015) Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular And Molecular Immunology* **13**, 301.

- [30] Casar JC, McKechnie BA, Fallon JR *et al.* (2004) Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Developmental Biology* **268**, 358-371.
- [31] Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA *et al.* (2018) Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biology*.
- [32] Batalha dMdAL, E. HC, Abraham A *et al.* (2015) Compensatory fetal membrane mechanisms between biglycan and decorin in inflammation. *Molecular Reproduction and Development* **82**, 387-396.
- [33] Mahesh PP, Retnakumar RJ, Mundayoor S (2016) Downregulation of vimentin in macrophages infected with live Mycobacterium tuberculosis is mediated by Reactive Oxygen Species. *Scientific Reports* **6**, 21526.
- [34] El-Fakharany EM, Uversky VN, Redwan EM (2017) Comparative analysis of the antiviral activity of camel, bovine, and human lactoperoxidases against herpes simplex virus type 1. *Applied biochemistry and biotechnology* **182**, 294-310.
- [35] Bafort F, Parisi O, Perraudin JP *et al.* (2014) Mode of Action of Lactoperoxidase as Related to Its Antimicrobial Activity: A Review. *Enzyme Research* **2014**, 517164.
- [36] Lee U, Nam YR, Ye JS *et al.* (2014) Cysteine-rich secretory protein 3 inhibits hepatitis C virus at the initial phase of infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450**, 1076-1082.
- [37] Schroder K, Hertzog Paul J, Ravasi T *et al.* (2003) Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 163-189.
- [38] Zeiler T, Taivainen A, Mäntyjärvi R *et al.* (2002) Threshold levels of purified natural Bos d 2 for inducing bronchial airway response in asthmatic patients. *Clinical & Experimental Allergy* **32**, 1454-1460.
- [39] Bosselaers IE, Caessens PW, Van Boekel MA *et al.* (1994) Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **32**, 905-909.
- [40] Lieske B, Jantz A, Finke B (2005) An improved analytical approach for the determination of bovine serum albumin in milk. *Lait* **85**, 237-248.
- [41] Leitner G, Merin U, Silanikove N (2004) Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of dairy science* **87**, 1719-1726.
- [42] Lemay DG, Lynn DJ, Martin WF *et al.* (2009) The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk. *Genome Biology* **10**, R43-R43.

- [43] ul Haq MR, Kapila R, Shandilya UK *et al.* (2014) Impact of Milk Derived β -Casomorphins on Physiological Functions and Trends in Research: A Review. *International Journal of Food Properties* **17**, 1726-1741.
- [44] Liu HC, Chen WL, Mao SJ (2007) Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. *Journal of dairy science* **90**, 547-555.
- [45] Cai Y, Jin J, Swanson SK *et al.* (2010) Subunit composition and substrate specificity of a MOF-containing histone acetyltransferase distinct from the male-specific lethal (MSL) complex. *J Biol Chem* **285**, 4268-4272.
- [46] Cui X, Hou Y, Yang S *et al.* (2014) Transcriptional profiling of mammary gland in Holstein cows with extremely different milk protein and fat percentage using RNA sequencing. *BMC Genomics* **15**, 226-226.
- [47] Abdelmegid S, Murugaiyan J, Abo-Ismael M *et al.* (2018) Identification of Host Defense-Related Proteins Using Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Milk Whey from Cows with Staphylococcus aureus Subclinical Mastitis. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 78.
- [48] Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P (2014) ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *The Journal of cell biology* **204**, 869.
- [49] Cammuso C, Porter C, Nims S *et al.* (2000) Hormonal induced lactation in transgenic goats. *Anim Biotechnol* **11**, 1-17.
- [50] Muroya S, Hagi T, Kimura A *et al.* (2016) Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in bovine mammary epithelial cell culture. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **7**, 8.
- [51] Zhang L, Boeren S, Hageman JA *et al.* (2015) Bovine milk proteome in the first 9 days: protein interactions in maturation of the immune and digestive system of the newborn. *PLoS One* **10**, e0116710.
- [52] Zhang L, Boeren S, Hageman JA *et al.* (2015) Perspective on calf and mammary gland development through changes in the bovine milk proteome over a complete lactation. *Journal of dairy science* **98**, 5362-5373.
- [53] da Costa WKA, de Souza EL, Beltrão-Filho EM *et al.* (2014) Comparative Protein Composition Analysis of Goat Milk Produced by the Alpine and Saanen Breeds in Northeastern Brazil and Related Antibacterial Activities. *PLoS ONE* **9**, e93361.
- [54] Osorio JS, Lohakare J, Bionaz M (2016) Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiol Genomics* **48**, 231-256.

- [55] Molinari E, Goicoechea O (1993) Anatomía del Desarrollo del Tracto Digestivo y Forma Corporal Externa Durante el Período Embrionario en el Caprino (*Copra hircus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* **22**, 123-143.
- [56] Guilloteau P, Zabielski R, Blum JW (2009) Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **60 Suppl 3**, 37-46.
- [57] Christensen B, Sørensen ES (2016) Structure, function and nutritional potential of milk osteopontin. *International Dairy Journal* **57**, 1-6.
- [58] Steen H, Jebanathirajah JA, Rush J *et al.* (2006) Phosphorylation Analysis by Mass Spectrometry: Myths, Facts, and the Consequences for Qualitative and Quantitative Measurements. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 172-181.
- [59] Olumee-Shabon Z, Boehmer JL (2013) Detection of Casein Phosphopeptides in Goat Milk. *Journal of Proteome Research* **12**, 3034-3041.
- [60] Abu-Serie MM, El-Fakharany EM (2017) Efficiency of novel nanocombinations of bovine milk proteins (lactoperoxidase and lactoferrin) for combating different human cancer cell lines. *Scientific Reports* **7**, 16769.
- [61] Medeiros GKV, Queiroga RCRE, Costa WKA *et al.* (2018) Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. *International Journal of Biological Macromolecules* **113**, 116-123.
- [62] Bernard H, Meisel H, Creminon C *et al.* (2000) Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins. *FEBS Letters* **467**, 239-244.

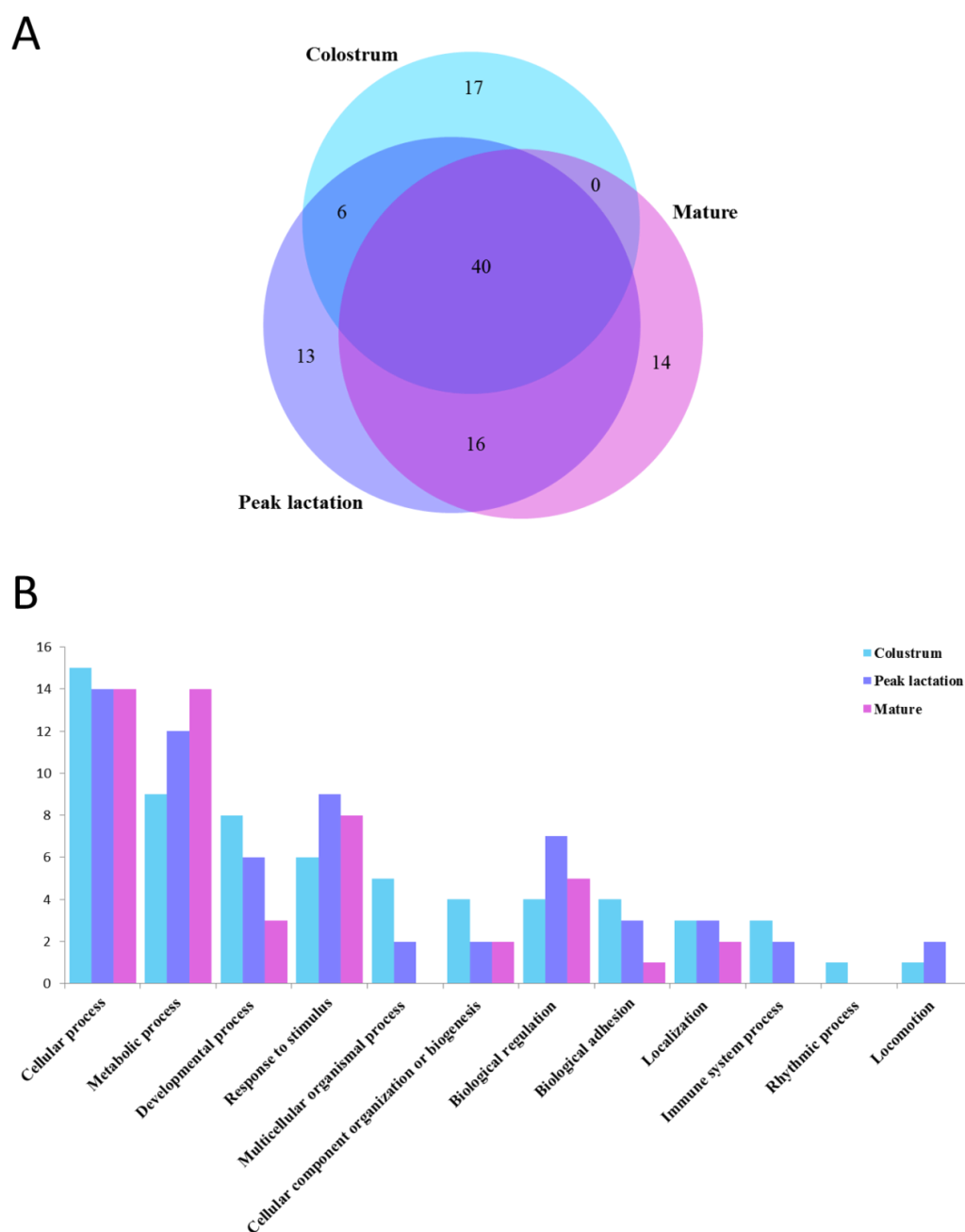
Figure 1

Figure 1 Comparison of proteins from the goat milk casein fractions over maturation. Venn diagram shows the overlap of identified proteins in colostrum, lactation peak and mature milk (A) and your relationships through of functional enrichment of each stage, excluding those 40 found in the 03 groups (B).

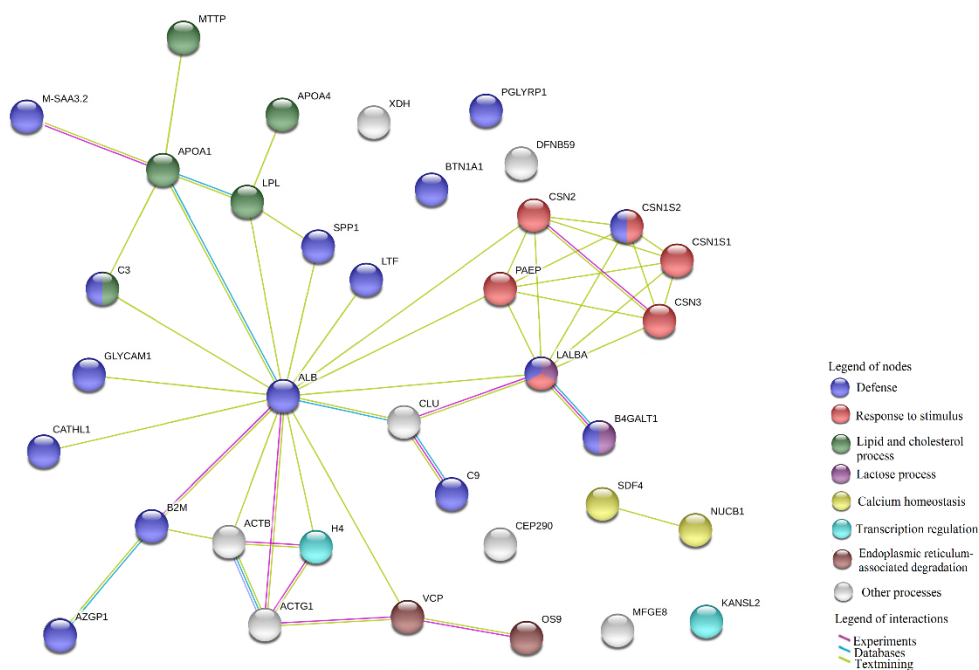
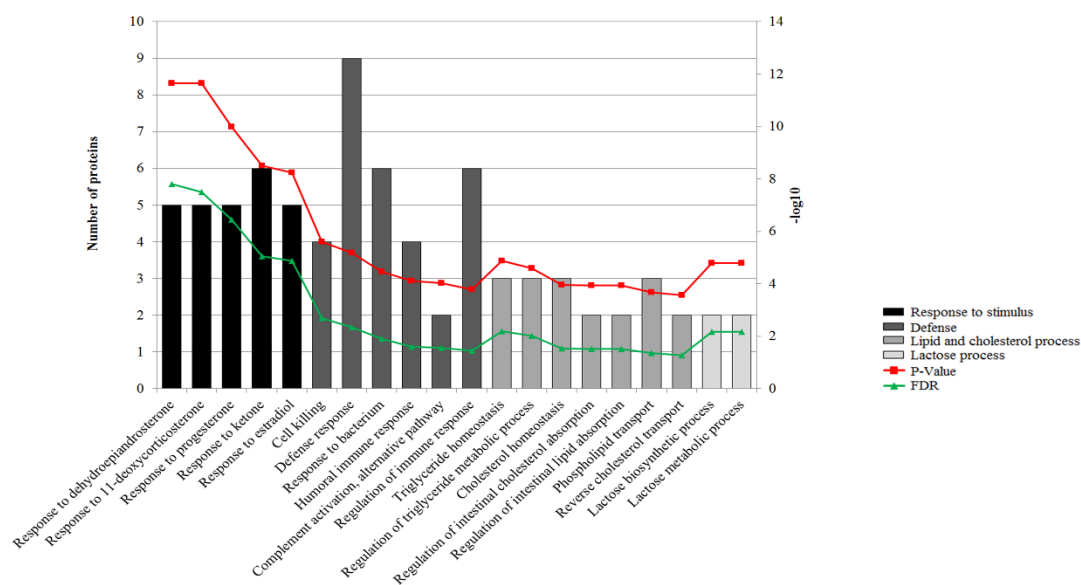
Figure 2.**A****B**

Figure 2 Functional analyse of conserved proteins in casein fractions over lactation. Protein-protein interaction network construed with *Bos taurus* IDs and its function co-related using STRING tool (A). Enrichment biological process by PANTHER database (B).

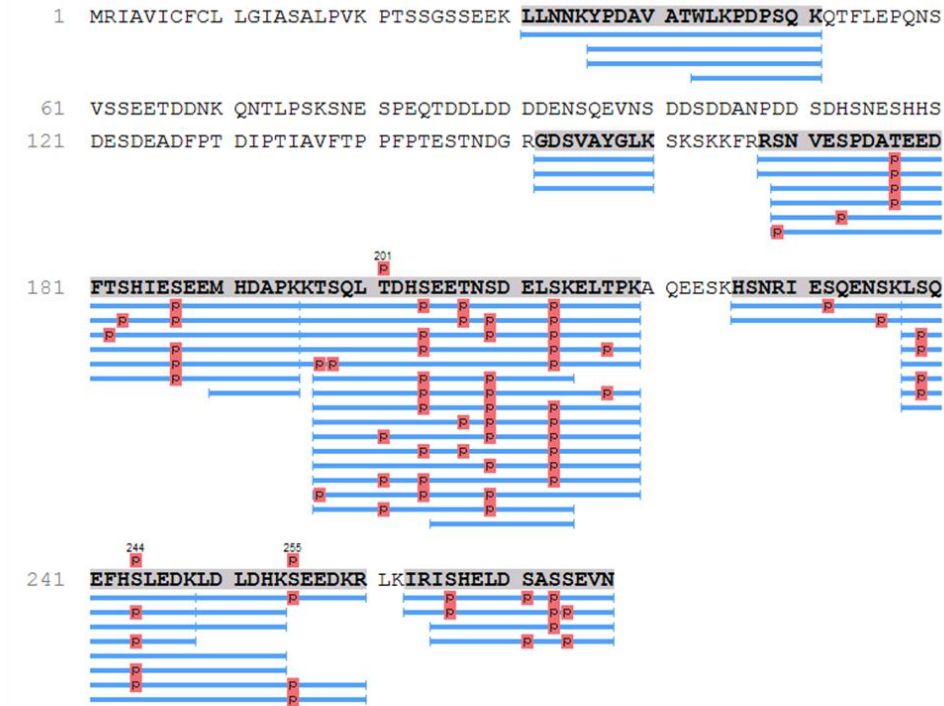
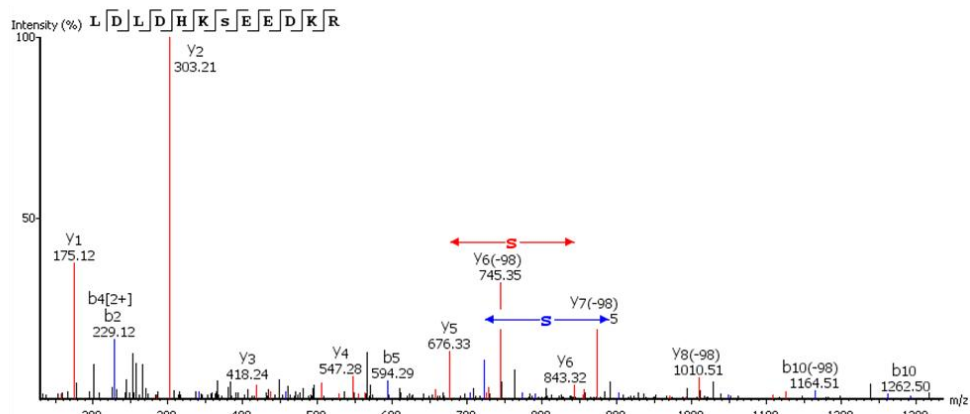
Figure 3**A****B**

Figure 3. Phosphorylation sites in Osteopontin. (A) Peptides spectrum matches indicated by blue lines below the sequences of Osteopontin (Uniprot id A9YUB7) with possible labeled phosphorylation sites in red. (B) MS/MS spectrum of monophosphorylated peptide LDLDHKS^(+79.97)EEDKR (residue 249 – 260) at m/z 782.85⁺² with reliable phosphorylation identified after spectral validation.

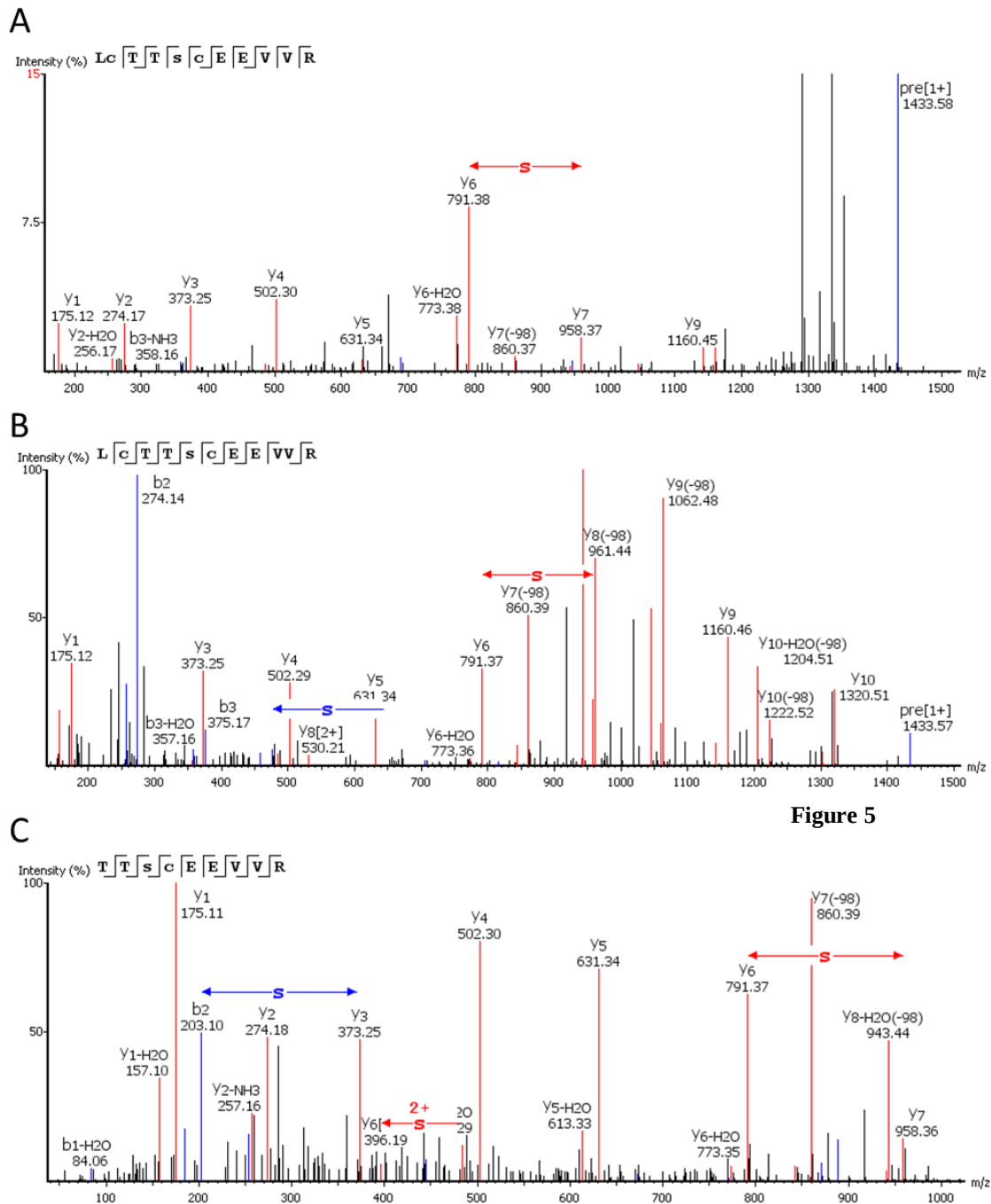


Figure 5

Figure 4 Representation of spectra corresponding to phosphorylated Ser55 from alpha-S2-casein through loss of 98 Da present in labeled y7. MS/MS spectrum of tryptic monophosphorylated peptide LC^(+57.02)TTS^(+79.97)C^(+57.02)EEVVR (residue 51 – 61) at m/z 1433.57¹(A) and at m/z 717.29² (B); peptide sequence TTS^(+79.97)C^(+57.02)EEVVR (residue 53 – 61) at m/z 580.73² (C).

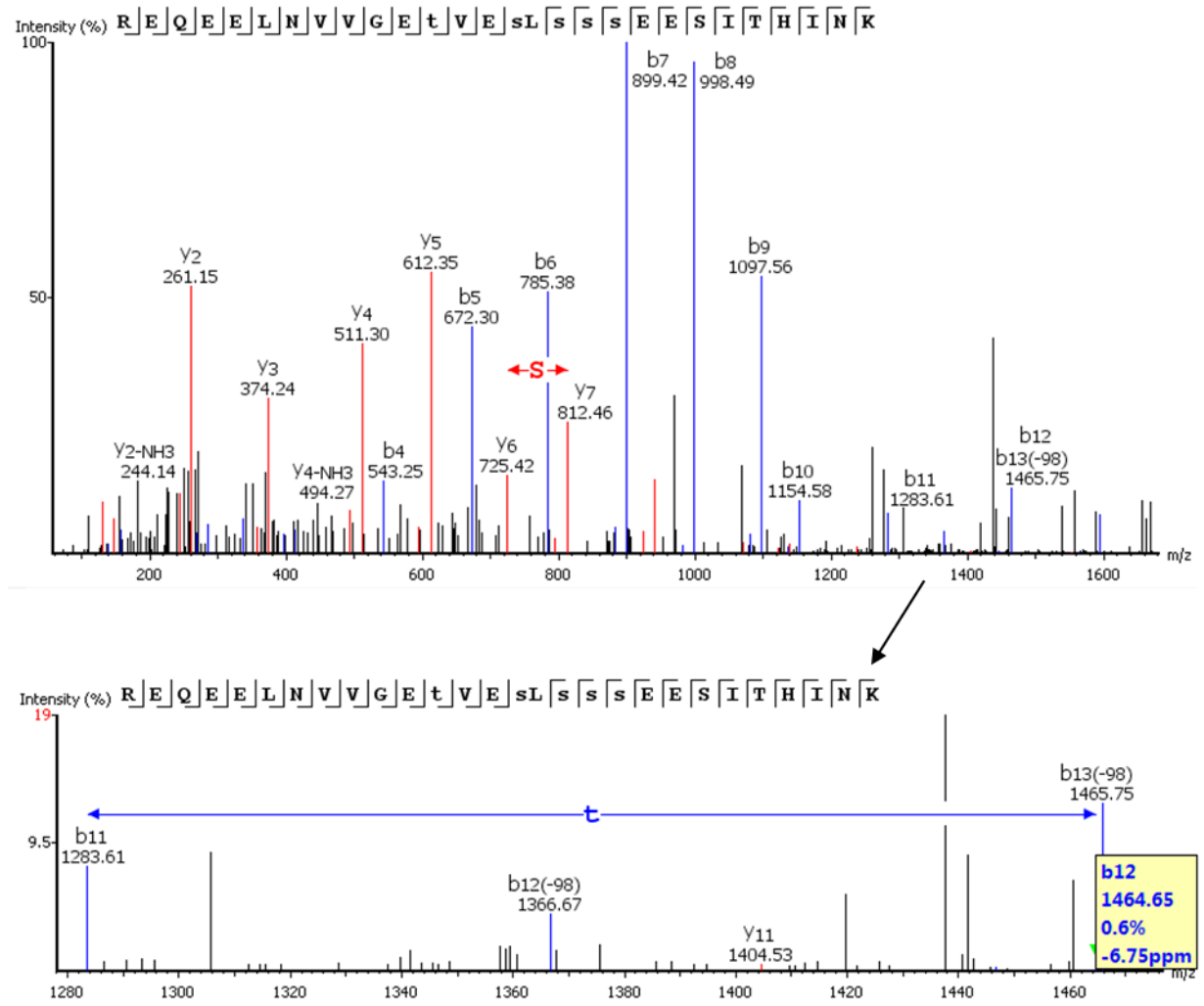


Figure 5 MS/MS spectrum of tetra-phosphorylated peptide REQEELNVVGET^(+79.97)VES^(+79.97)LS^(+79.97)S^(+79.97)S^(+79.97)EESITHINK at m/z 1181.79⁺³ from beta casein (residue 16 – 43) with y7 fragment ion showing Ser34 no phosphorylated and b12 ion featured loss of 98 Da indicate phosphorylated Thr27 in a peptide sequence with molecular weight corresponding to 04 phosphorylation sites.

Table 1 Phosphorylation and mutation sites identified in proteins from goat milk casein fractions

Protein	Peptide sequence	m/z	Residue
K-casein	TEVPAINTIASAEPTVHSTPTTEAIVNTVDNPEAS ^(+79.97) SESIASASETNTAQVTS ^(+79.97)	1910.536	S189/S172
	TEV	+3	
	KDQDKTEL ^(sub V) PAINTIASAEPTVH	1189.61 ⁺²	V140L
	TEL ^(sub V) PAINTIASAEPTVH	882.45 ⁺²	V140L
β-casein	REQEELNVVGET ^(+79.97) VES ^(+79.97) LS ^(+79.97) S ^(+79.97) S ^(+79.97) EESITHINK	1181.79 ⁺³	T27/S30/S32/ S33/
	FQS ^(+79.97) EEQQQTEDELQDK	1031.41 ⁺²	S34
α-s1-casein	HPINHQ ^(sub R) GLSPEVL ^(sub P) NENLLR	727.38 ⁺³	R24Q/ P31L
	DIGS ^(+79.97) ES ^(+79.97) TEDQAMEDAK	943.32 ⁺²	S61/S63
	EIVPNS ^(+79.97) AEQK	597.77 ⁺²	S90
	KYNVPQLEIVPKS ^(+79.97) AEEQLHSMK	662.83 ⁺⁴	S130
α-s2-casein	MEHVS ^(+79.97) S ^(+79.97) S ^(+79.97) EEPINIFQEIYKQEK	727.05 ⁺⁴	S23/S24/S25
	M ^(+15.99) EHL ^(sub V) S ^(+79.97) S ^(+79.97) S ^(+79.97) EEPINIFQEIYK	1275.50 ⁺²	V22L/S23/S24/S25
	LC ^(+57.02) TTS ^(+79.97) C ^(+57.02) EEVVR	717.29 ⁺²	S55
	NANEEYSIRS ^(+79.97) S ^(+79.97) S ^(+79.97) EES ^(+79.97) AEVAPEEIK	1039.71	S72/S73/S74/S77
	EQLS ^(+79.97) TSEENSK	666.27 ⁺²	S145
	EQLSTS ^(+79.97) EENSK	666.27 ⁺²	S147
	EQLS ^(+79.97) TS ^(+79.97) EENSKK	770.30 ⁺²	S145/S147
	TIDMES ^(+79.97) TEVFTK	740.81 ⁺²	S159
Osteopontin	LDLDHKS ^(+79.97) EEDKR	782.85 ⁺²	S255

PTM: Phosphorylation in STY (+79.97 Da); Oxidation in M (+15.99 Da).

4.2 ARTIGO 2: PROTEOMIC AND POTENTIALITIES OF PROTEINS AND PEPTIDES OF CASEÍNA FRACTION OF GOAT MILK

Paula Perazzo de Souza Barbosa¹, Thaís Susana Marinho Carneiro², Maristela Álvares Alcântara³, Luciano da Silva Pinto⁴, Maria Teresa Bertoldo Pacheco⁵; Ângela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro⁶, Carlos Alberto de Almeida Gadelha⁷, Tatiane Santi Gadelha⁸

^{1, 3}Postgraduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

²Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

⁴Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

⁵Center for Food Science and Quality (CCQA) / Institute of Food Technology

⁶Center for Technology and Regional Development, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^{7, 8}Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

Abstract

The milk is high in proteins, which perform various functions, being source of amino acids. In this work, the casein fraction (CNF) of milk goats was obtained by isoelectric precipitation at pH 4.1, and hydrolysed with pepsin and trypsin. The FCN was analysed for the presence of amino acids and characterized by PAGE-SDS and 2D. The FCN is rich in amino acids and has high content of glutamic acid and proline. The hydrolyzates showed degree of hydrolysis of 6.7% (pepsin) and 18% (trypsin) and were analyzed by PAGE-Tricin. The hydrolyzates showed activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*. Only for *Salmonella* spp there was difference of action between the FCN and the hydrolyzates. There was difference between action of peptides and the FCN for FRAP and ABTS, but not for DPPH. The FCN and its peptides can be used for therapeutic purposes and/or food.

1 Introduction

Milk is composed of a complex of substances, including proteins, which perform a variety of functions in addition to their primary role as the primary source of amino acids for newborns (Beck et al., 2015).

The domestic goat (*Capra hircus*) is breed in several parts of the globe and it's an important source of diverse products (Dong et al., 2013). Its milk is consumed in many places in the world.

Milk proteins exert many functions in vivo by means of bioactive peptides, which are inactive when inside of the original proteic sequence (Bhat, Kumar, & Bhat, 2015). They can be obtained in vitro by fermentation, or hydrolysis of milk, or by action of gastrointestinal enzymes and they can have of two to twenty amino acid residues (Mohanty et al., 2015).

Casein is the main fraction of ruminant milk and it's equivalent to approximately 80% of the total proteins: α 1-casein, α 2-casein, β -casein and κ -casein. Casein variation is explained by genetic polymorphism, environmental, nutritional and physiological factors (Sgarbieri, V. C. 2005).

The milk proteins have high biological value and present in their composition peptides with different biological functions. For goat milk, peptides with antibacterial (Esmaeilpour et al., 2016) and antioxidant activities (Ahmed et al., 2015) have been reported.

These activities are particularly interesting because of their ability to prevent or retard the microbiological and oxidative action of food, thus prolonging shelf life and acting in the fight against bacteria, including those carried by food (Esmaeilpour et al., 2016).

Foodborne diseases can be infectious or toxic, caused by pathogens such as bacteria, viruses and parasites, and can cause severe diarrhea or debilitating infections, acute intoxications or long-term diseases such as cancer. Among the most common bacteria associated with foodborne diseases are those belonging to the genera *Salmonella*, *Listeria* and *Escherichia*, which may become resistant to commercially available antimicrobials (Penesyan, Gillings, & Pausen, 2015).

On the other hand, increment consumer demands for safe applications of oral and antioxidant-rich topical products leads to an increased need to search for new sources of natural antioxidants rather than the synthetic ones. The free radical-induced damage contributes to the pathogenesis and pathophysiology of many chronic health problems and the inhibition of free radical formation is a therapeutic strategy to prevent oxidative stress. The

body has natural defenses against oxidative stress, but exogenous antioxidants present in foods can aid in the process, such as the amino acids of proteins (Pisoschi, & Pop, 2015).

The enzymatic hydrolysis of caseins generates peptides that are rich in phosphoserine residues capable of acting on oxidative stress due to phosphate groups with close proximity to the peptic chain, which creates a polar and an anionic domain that can sequester cationic metal ions (Awad et al., 2016).

In this context, the present work characterized the casein fraction of caprine milk obtained by isoelectric precipitation, and evaluated the antimicrobial and antioxidant activity of peptides obtained through hydrolysis in vitro with the enzymes pepsin and trypsin.

2 Material and methods

2.1 Samples of caprine milk

Goat milk samples were obtained from the Caprinocultura Sector of the Human, Social and Agricultural Sciences Center (CCHSA) of the Federal University of Paraiba (UFPB), Câmpus III, Bananeiras, PB, Brazil. The goat milk was collected from confined animals, with a lactation period of 120 ± 2 days. Directory of Sisgen access number A92C05B

2.2 Preparation of goat milk proteins

The goat milk was skimmed by centrifugation (4856 x g, 4 °C, 20 min - NT 815 Novatecnic) and subjected to isoelectric precipitation with hydrochloric acid (HCl) at pH 4.1 (Ceballos et al. 2009), resulting in serum, the soluble fraction, and in the precipitate, corresponding to the casein fraction (FCN).

The FCN was washed three times with distilled water (4856 x g, 4 °C, 20 min - NT 815 Novatecnic) and solubilised with sodium hydroxide (NaOH) to determine the soluble proteins by the method described by Bradford (1976). Then the FCN was dialysed against distilled water on cellulose membrane (cut-off 14 kDa) and dried by lyophilization (Liotop model L101) in order to be used in the subsequent analyzes.

2.3 Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out according to the methodology of Laemmli (1970), using the stacking gel prepared in the concentration of 3.5% polyacrylamide (w/v) and the separation gel in the concentration of 20% (w/v). The gel was stained with Coomassie blue R-250 for visualization of the proteins. Molecular weight of the protein bands was determined with reference to the protein marker used as standard ranged from 225 to 12 kDa (Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range, GE Healthcare Life Sciences). The gel was digitized and the detected spots were identified by ImageMaster™2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare Bio- Sciences, WI, USA).

2.4 Two-dimensional electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was performed with the FCN according to the methodology described by O'Farrel (1975). In the procedure, 1 mg of sample was diluted with 7 mol/l urea, 2 mol/L thiourea, 0.5% IPG buffer, DTT, 2% CHAPS and 0.002% bromophenol blue. The nonlinear strip (13 cm, pH 3 to 11) was rehydrated in IPGbox for 18 h at $\pm 25^{\circ}\text{C}$ (GE Healthcare, WI, USA), subjected to isoelectric focusing (IPGPhor Healthcare® GE III) and, after that, stored in 1.5 mol/L TRIS-HCl pH 8.8 solution with 1 ml of 10% SDS (Healthcare, 2010).

The next day, the strip was equilibrated in solution with DTT and iodacetamide, and transferred to a 15% polyacrylamide gel to perform second run (SE 600 Ruby System, GE Healthcare). The protein marker used as standard was the same as that used in SDS-PAGE one-dimensional electrophoresis.

After running, the gel was fixed in acetic acid solution, 95% ethanol and mili-Q water (10/40/50), and stained with 2% Coomassie Brilliant Blue G-250 for 72 hours. After discoloration with methanol solution, the gel was digitized and the detected spots were identified by ImageMaster™2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare Bio- Sciences, WI, USA).

2.5 Determination of total amino acids

The amino acid composition of the FCN was determined according to White, Hart, & Kry (1986). The sample was subjected to pre-column derivatization of amino acids released after the acid hydrolysis of the proteins (6 mol/L HCl) under heating ($115^{\circ}\text{C}/22\text{ h}$). Amino acid analysis was performed on liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan)

on reverse phase C18-Luna-Phenomenex (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA) column.

Amino acid identification was performed by comparison with external standard (Pierce, PN 20088), and for the quantification the internal standard α -aminobutyric acid (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) was used, according to White, Hart, & Kry (1986) and Hagen, Frost, & Augustin (1989). The determination of tryptophan was carried out after enzymatic hydrolysis with pronase (40 °C/22-24 h), followed by colorimetric reaction with 4-dimethylaminobenzaldehyde (DAB) in 10.55 mol/L sulfuric acid (H₂SO₄) and reading at 590 nm. The tryptophan content was calculated from a standard curve of L-tryptophan (Spies, 1967).

2.6 In vitro enzymatic hydrolysis of casein fraction of caprine milk

The FCN of goat milk was submitted to enzymatic hydrolysis in vitro with pepsin and trypsin, separately. The FCN was dissolved in distilled water (1 mg/mL; m/v) and the pH adjusted to 2.5 with HCl for hydrolysis with pepsin, and pH 8.0 with NaOH for trypsin hydrolysis.

The solubilized and pH adjusted FCN was incubated with enzyme solution, at enzyme-to-substrate (E:S) ratio of 1:50 (v/v), at 39 °C and 38 °C for pepsin and trypsin, respectively, under constant stirring (150 rpm) for 2 h. The reactions were stopped with heating at 95 °C for 5 min, then placed on ice for 5min to irreversibly inactivate of enzymes, followed by centrifugation at 10000 rpm. The supernatant was equivalent to the hydrolyzates (of pepsin and trypsin – HDP and HDT, respectively), which was dialysed against distilled water on a cellulose membrane (cut-off 500 Da).

2.7 Degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis of the hydrolysates was determined by the method of O-phthaldialdehyde (OPA) according to Church et al. (1983). The amino acid Serine was used as standard.

2.8 Electrophoretic profile in polyacrylamide gel in the presence of tricine

The production of low molecular weight proteins by means of the enzymatic hydrolysis was verified by means of polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of

Tricine, according to the methodology of Schagger, & Von Jagow (1987), in which a three-phase gel was used: stacking (2 cm, 4% T, 3% C), spacer (1 cm, 10% T, 3% C), and separation (5,5 cm, 16.5% T, 3%). Protein markers used as standards had molecular weights of 38, 31, 24, 17, 12, 8.5, 3.5 kDa (Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range, GE Healthcare Life Sciences).

2.9 Antimicrobial activity

The antibacterial activity of the FCN and the hydrolysates (HDP and HDT) was tested according to the norms of protocol M7-A6 of the National Comit e For Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2006), by the technique of Microdilution in Broth, with *E. coli*, *Salmonella* sp and *L. monocytogenes*. All the work of handling of the bacterial cultures was carried out in Microbiological Safety Cabin.

Each bacterial strain, stored at 4  C, was grown to grow in 4 mL of Brain Heart Infusion (BHI) medium at 37  C until approximately 1.5×10^8 CFU/mL, Mc Farland's scale of 0,5.

For the antimicrobial test, 96-well flat background Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) microplates were used. Each well received 100  L of medium. Subsequently, 100  L of the sample (1 mg/mL; m/v) was distributed and serial dilutions in triplicate were made from this mixture. Then, 20 L of bacterial suspension (10^6 CFU mL⁻¹) was added to each well containing the sample diluted in the medium.

The negative control encompassed only the medium, and the positive control, bacterium and medium. The plate was incubated at 37  C in a MultiskanTM GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific) spectrophotometer, and bacterial growth was monitored by measuring the absorbance at 630 nm, every 60 min, for 24 h.

The results were recorded by increasing the optical density (mean of the absorbance readings 630 nm) of each microorganism as a function of time, in hours. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was obtained and considered the lowest concentration of the sample capable of inhibiting bacterial growth.

2.10 Antioxidant activity by radical capture 2,2-diphenyl-1-pyrrhidrazyl (DPPH)

The sequestering capacity of DPPH radical by FCN and the hydrolyzates (HDP and HDT) was determined according to the methodology described by Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), in total absence of light.

An aliquot of 30 μL of each sample (20 mg/mL) was added to the 1.5 mL DPPH radical in methanol (0.06 mmol/L). The systems were kept under constant stirring for 30 min, followed by centrifugation at 14000 rpm. The radical sequestration activity was verified at 517 nm in UV-VIS spectrophotometer. For standard curve, a trolox solution (2 mmol/L) was used, with concentrations ranged from 100 μL to 2000 μL . Results are expressed in mMTx/mg

2.11 Antioxidant activity through the capacity of radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonic acid) - ABTS

The sequestering capacity of the ABTS radical by FCN, HDP and HDT was determined following the methodology proposed by Re et al. (1999). The ABTS radical was prepared from a stock solution of ABTS (7 mmol/L) and a stock solution of potassium persulphate (140 mmol/L).

An aliquot of 30 μL was added to 1.5 mL of the ABTS radical solution in ethanol. After homogenization, the zero time reading of the control containing free radical and ethyl alcohol P.A. was performed, and all triplicate assays were maintained at 25 °C for 6 minutes. The radical sequestration activity was verified at 734 nm in UV-VIS spectrophotometer Ultrospec 1100 pro (Amersham, Biosciences). For standard curve, a trolox solution (2 mmol/L) was used, with concentrations ranged from 100 μL to 2000 μL . Results are expressed in mMTx/mg

2.12 Ferric reduction capacity

The ferric reduction capacity was evaluated using the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) methodology, as described by Rufino et al. (2006), with modifications. The FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (300 mmol / L - pH 3.6) with a solution of 10 mmol / L TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) in 40 mmol / L HCl and 20 mmol / L of 10: 1: 1 (v/v/v) FeCl_3 . An aliquot of 100 μL of each sample (20 mg / mL) was added to 3.4 mL of the FRAP reagent. After homogenization, the systems, in triplicate, were maintained at 37 °C for 30 minutes under constant stirring (100 rpm). Then, the activity of ferric (Fe^{3+}) reduction

to the ferrous (Fe^{2+}) form of the FCN and the hydrolysates was checked at 593 nm in Ultrospec 1100 pro UV-VIS spectrophotometer (Amersham, Biosciences), the blank, containing solvent and FRAP reagent. A calibration curve prepared with different concentrations of Trolox, ranging from 100 to 1000 $\mu\text{mol/L}$, was used. The results were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) $\pm$ standard deviation, calculated by the equations used in the DPPH and ABTS assays.

3 Results and discussion

3.1 Amino acids

Nutritionally, amino acids are classified as essential and non-essential. Essential amino acids must be acquired through diet; nonessentials are synthesized by the metabolic system of living organisms (Wu, 2013)

The analyzed FCN (Table 1) has eighteen of the twenty protein amino acids, with the presence of all the essential ones and values above that established by the FAO/WHO standard.

The levels of amino acids present in the sample are mostly results of presence α - and β -caseins and were similar to those found by Ceballos et al., 2009. The FCN presented high content of glutamic acid, followed by proline; and low cysteine and tryptophan contents.

Amino acids can perform functions other than compose the body's proteins. Glutamic acid acts as an excitatory neurotransmitter and predominates in the Central Nervous System, having a central role in a variety of brain functions (Fontana, 2015), as for example, it is precursor of gamma-aminobutyric acid (GABA – Gamma-AminoButyric Acid). High levels of glutamic acid also occur in mare, cow and human milks (Uniacke-Lowe, Huppertz, & Fox, 2010).

Glycine is the main neurotransmitter inhibiting of brainstem and spinal cord, it may exhibit excitatory behavior by increasing sensitivity to glutamate to its receptors. Unlike the others, glycine is not synthesized by the body, being obtained from the diet (Razak et al., 2017).

Tryptophan is an important antioxidant component and precursor of the serotonin sedative and soothing substance that decreases hyperactivity, improves mood by reducing people's aggressiveness. We can also verify the antioxidant action when amino acids such as arginine and cysteine and histidine are present in the sample (O'mahony et al., 2015).

Proline is part of the cytoskeleton composition, signaling cascades or initiation of transcription (Neduva, & Russell, 2007). After glycine, proline is the most prevalent amino acid in collagen (Albaugh, Mukherjee, & Barbul, 2015), followed by lysine. Some amino acids serve as substrates for the synthesis of others, such as phenylalanine, which have a role in the synthesis of tyrosine; of isoleucine, which has a role in the synthesis of glutamine responsible for the formation of nitrogenous bases and alanine; and the serine, which is a substrate for lysine synthesis (Razak et al., 2017).

The results of the chemical amino acid scores show that they make up a protein of high nutritional value for all stages of human life. Among the essential amino acids, there is a high content of the branched ones (valine, leucine and isoleucine), mainly used for the restoration and skeletal muscle growth.

The analysis of the FCN shows that goat milk is a source rich in amino acids used in protein synthesis, in the synthesis of neurotransmitters, like antioxidants, and source of other low molecular weight compounds with physiological importance, including for humans.

3.2 Polyacrylamide - SDS and Bidimensional gels

The goat's milk was fractionated generating the FCN, which were analyzed by SDS-PAGE, through which it was possible to identify and to estimate the molecular masses of the main proteins (Figure 1).

Goat milk presented the casein proteins with predominance of α s- casein. The masses of α s-, β - and κ caseins were estimated at 27.6, 23.8 and 24 kDa.

Casein α s1 is considered one of the main allergens in bovine milk. There are reports that goat milk is less allergenic, due to the low amount or even absence of α s1 casein. These changes are due to the genetic polymorphisms of milk proteins environmental, nutritional and physiological factors (El-Agamy, 2015).

Through the analysis of two-dimensional electrophoresis gel of the casein fraction, the presence of 44 spots in the pH range 3-11 was observed, with molecular masses between 7 and 71 kDa, a larger number in relation to the bands identified in SDS-PAGE, suggesting the presence of other proteins and isoforms (Figure 2).

The FCN obtained by the acid precipitation of goat milk at pH 4.1 shows that this protein pool has an acidic character, probably due to the high levels of glutamic and aspartic amino acids present in the FCN, as verified in amino acid analysis.

The minimum solubility and pI of the caseins may vary by species. Acid precipitation of milk is usually done at pH 4.6 for bovine milk at pH 4.2 for mare's milk (Uniacke-Lowe, Huppertz, & Fox, 2010) and at pH 4.1 of goat milk (Ceballos, et al., 2009).

In SDS-PAGE, the protein bands are analyzed in a one dimension, so they can normally be separated only by their molecular mass and not by pI. Two-dimensional electrophoresis combines two distinct separation processes: isoelectric focusing and SDS-PAGE.

In the isoelectric focusing, the proteins are separated according to their native charges (pI) where we can verify the presence of the isoforms and probable post-translational changes in the range of molecular mass of 24 kDa to 38 kDa where we verified the masses for the caseins. In the second dimension, the proteins are separated by virtue of their mass (Rocha et al., 2005).

3.3 Analysis of the hydrolysis degree of FCN by OPA method

In vitro enzymatic hydrolysis for the release of peptides from the intact protein is a strategy that allows the selection of the substrate, the specific enzymes and the reaction conditions and, thus, in the profile of peptides produced to be tested. Several proteases can be used to hydrolyze proteins, and the extent of protein breakdown can be assessed by measuring the degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis of the FCN after pepsin action was analyzed by the OPA method. We observed a percentage of 6.7% for the hydrolyzate obtained with pepsin at pH 2.0 and temperature of 38 °C with E: S 1:50 and time of 2 h. However, the results presented by Carreira et al. (2003) showed the temperature at 40 °C was advantageous for the hydrolysis, because it reduces the contents of large peptides.

Measurement of the degree of hydrolysis of the FCN after trypsin action pH 8.0 and temperature of 39 °C with E:S 1:50 and time of 2 h analyzed by the OPA method was 18%. The percentage of hydrolysis for trypsin can vary with E:S concentration, pH and temperature, results demonstrated by several authors. Lira et al. (2010) observed a degree of hydrolysis of casein from goat's milk Moxotó, with trypsin of 29.55% at pH 8.5, with E:S 1:150, for 5 h, at 40 °C .

In recent years, evidence that diet caseins are an abundant source of biologically active peptides has been increasing (Mohanty et al., 2016). The enzymatic hydrolysis of proteins releases peptides derived from innocuous and inexpensive sources and free amino acids and

thus can contribute to enhance the nutritional value of food and be used in the food industry and medicine (Bhat, Kumar, & Bhat, 2015).

3.4 Analysis of enzymatic hydrolysis of FCN by PAGE-SDS tricina

The PAGE-SDS-Tricin electrophoresis allows the identification of peptide chains of low molecular mass, ranging from 1 to 100 kDa.

The protein profile obtained after digestion with pepsin and trypsin shows that the enzymes were able to hydrolyze the FCN, since the proteins of high molecular mass aren't present in the SDS-PAGE Tricine electrophoresis, and the presence of peptides of estimated molecular mass in 13 kDa which demonstrates the efficiency of this enzyme for hydrolysis of α s1, β and κ -casein (Figure 3).

These data corroborate with those of Lira et al (2010) who observed that the hydrolysis of goat casein with pepsin, and Trujillo et al. (1997), who observed protein bands resulting from casein hydrolysis by chymosin and they showed peptides with molar masses below 14.4 kDa. However, Lira et al (2010) didn't observe differences in the profiles for the hydrolysates obtained with pepsin and trypsin, whereas it was possible to differentiate electrophoretically the lowest and the highest degree of hydrolysis with papain.

3.5 Antimicrobial activity of FCN, HDP AND HDT

By means of the obtained values we verified that the proteic hydrolyzes were able to present a minimum inhibitory concentration less or equal to the FCN. However, the casein fraction and the peptides obtained by hydrolysis had significant effects on the bacteria used in this study, reducing its growth with minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranging from 500 to 15.62 μ g / mL (Table 2):

The lowest MIC was observed with the HDT for *S. aureus* in relation to the other samples. However, for *E. coli* and *L. monocytogenes* both FCN and HDP had a higher MIC than HDT. For *Salmonella* spp., it was observed that the MIC of HDP and HDT hydrolysates were higher than FCN.

The peptides generated by the hydrolyses with pepsin and trypsin have the ability to act on the pathogenic microorganisms with concentrations lower than those required for the FCN, thus justifying the importance of hydrolysis and the possibility of using three different products to combat the same microorganism, thus avoiding resistance.

Peptides are smaller molecules and this facilitates their rapid action against pathogens, damaging their cell membrane through the formation of transmembrane pores, exhibiting direct microbicidal activities against bacteria (Mohanty et al., 2016).

Esmailpour et al. (2016) obtained peptides from caseins hydrolysed with trypsin, ficin and trypsin followed by trypsin, and it was reported that the hydrolysates had an action under the strains *E. coli* and *Bacillus cereus* better than in the native proteins. Jrad et al (2015) hydrolysed camel milk caseins showed activity against *Listeria innocua*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, better than proteins in native form.

3.6 Antioxidant activity of FCN, HDP and HDT

The interest of evaluating the antioxidant capacity of a sample is a result of the importance of antioxidants for biological systems. Free radical-induced damage to oxidative stress contributes to the pathogenesis and pathophysiology of many chronic health problems (Pisoschi, & Pop, 2015). Inhibition of free radical formation provides a therapeutic strategy to prevent oxidative stress.

The antioxidant activity of the proteins present in the FCN and the hydrolysates was verified by the capture methods of the DPPH and ABTS radicals and the Fe^{3+} reduction capacity (Table 3).

The tests were carried out with three different agents due to the fact that the antioxidant action of proteins occurs through multiple pathways, including the inactivation of free radicals, both in food and in biological systems (Ahmed et al., 2015).

In the FRAP and ABTS tests all the hydrolysates had significantly higher activity than the FCN, but for the FRAP test the HDP presented a higher antioxidant capacity, followed by the HDT. However, the ABTS test with HDT had a higher antioxidant capacity, followed by the HDP in relation to the FCN.

The FCN used in the study presents the amino acids tyrosine and cysteine, which may explain its antioxidant action and its hydrolysates. The antioxidant action for the sequestration of ABTS and DPPH radicals may be related to tyrosine presence in the proteins of the FCN and amino acids containing sulfur, such as cysteine. Tyrosine has a hydroxyl in its side chain, and cysteine a thiol group, which can donate hydrogen to the radicals and stabilize them.

The lower antioxidant activity of the FCN in relation to the hydrolysates may be in the fact that the amino acid residues of the protein sequence interact with each other and stabilize the native conformation, which may hamper the accessibility of the side chains in the

antioxidant action. The increase of the activity after the hydrolysis may be related to the annihilation of its tertiary structure, which may increase the accessibility of the amino acid residues responsible for the action (Ahmed et al., 2015).

Kumar et al. (2016) used the methods ABTS, DPPH, FRAP and verified that camel milk casein hydrolysates is capable of presenting antioxidant activity in different ways.

Ahmed et al. (2015) verified the antioxidant activity of casein and goat milk hydrolysates obtained under different conditions using the DPPH method. Moreno-Montoro et al. (2017) obtained considerable antioxidant activity for ABTS, DPPH and FRAP for fermented goat's milk.

4 Conclusions

The casein fraction of goat milk is rich in essential and non-essential amino acids and proteins. The hydrolysis of the casein fraction, with the enzymes pepsin and trypsin, produces antimicrobial and antioxidant peptides, and offers an interesting opportunity for their application as natural agents that can be used for therapeutic and/or food purposes.

Acknowledgments

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for funding the work, and to Professor George Rodrigo Beltrão da Cruz, then head of the caprine sector of the câmpus III of the UFPB, Bananeiras/PB for making available the milk samples used here.

Compliance with the ethical standards: None of the authors conducted studies directly with humans or animals.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

References

Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>.

Albaugh, V. L., Mukherjee, K., & Barbul, A. (2017). Proline precursors and collagen synthesis: biochemical challenges of nutrient supplementation and wound healing. *The Journal of nutrition*, 147(11), 2011-2017. Doi: 10.3945/jn.117.256404.

Awad, S., El-Sayed, M. I., Wahba, A., El Attar, A., Yousef, M. I., & Zedan, M. (2016). Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of dairy science*, 99(11), 8499-8510. Doi: 10.3168/jds.2015-10626.

Beck, K. L., Weber, D., Phinney, B. S., Smilowitz, J. T., Hinde, K., Lönnerdal, B., Ian Korf & Lemay, D. G. (2015). Comparative proteomics of human and macaque milk reveals species-specific nutrition during postnatal development. *Journal of proteome research*, 14, 2143-2157. DOI: 10.1021/pr501243m.

Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of food science and technology*, 52, 5377-5392. DOI 10.1007/s13197-015-1731-5.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

Carreira, R. L., Silva, V. D. M., Morais, H. A., MOTTA, S. D., Junqueira, R. G., & Silvestre, M. P. C. (2003). Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 625-634.

Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., & Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 322-329. Doi:10.1016/j.jfca.2008.10.020.

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2).

Dong, Y., Xie, M., Jiang, Y., Xiao, N., Du, X., Zhang, W., Tosser-Klopp, G., Wang, J., Yang, S., Liang, J., Chen, W., Chen, J., Zeng, P., Hou, Y., Bian, C., Pan, S., Li, Y., Liu, X., Wang, W., Servin, B., Sayre, B., Zhu, B., Sweeney, D., Moore, R., Nie, W., Shen, Y., Zhao, R., Zhang, G., Li, J., Faraut, T., Womack, J., Zhang, Y., Kijas, J., Cockett, N., Xu, X., Zhao, S., Wang, J. & Wen, W. (2013). Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nature biotechnology*, 31, 135. Doi:10.1038/nbt.2478.

Egito, A. S., Miclo, L., López, C., Adam, A., Girardet, J. M., & Gaillard, J. L. (2002). Separation and characterization of mares' milk as1-, b-, k-caseins, g-casein-like, and proteose

peptone component 5-like peptides. *Journal of Dairy Science*, 85, 697 - 706. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74126-X.

Esmaeilpour, M., Ehsani, M. R., Aminlari, M., Shekarforoush, S., & Hoseini, E. (2016). Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. *Comparative Clinical Pathology*, 25, 599-605. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.10.015>.

El-Agamy, E. I. (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 64-72.

Fontana, A. C. (2015). Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *Journal of neurochemistry*, 134(6), 982-1007. DOI: 10.1111/jnc.13200.

Jrad, Z., El Hatmi, H., Adt, I., Khorchani, T., Degraeve, P., & Oulahal, N. (2015). Antimicrobial activity of camel milk casein and its hydrolysates. *Acta Alimentaria*, 44(4), 609-616. DOI: 10.1556/066.2015.44.0034.

Kumar, A., Rout, P. K., & Mohanty, B. P. (2013). Identification of milk protein polymorphism in Indian goats by 2D gel electrophoresis. *J Proteomics Bioinform*, 6, 1-4. <http://dx.doi.org/10.4172/jpb.1000252>.

García, V., Rovira, S., Boutoia, K., López, M. B. (2014). Improvements in goat milk quality: a review. *Small Ruminant Research*. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>.

Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>.

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

Lira, T. B. F., Bezerra, V. S., de Oliveira Silva, F., Dias, G. M. P., de Lima Filho, J. L., Porto, T. S., & Porto, A. L. F. (2010). Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(9), 1036-1043. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000900014>.

Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P. K., Pattnaik, R., Mohapatra, S., & Saini, M. R. (2016). Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties*, 19, 837-846. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1048356>

Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P. S. (2015). Milk derived bioactives peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1-7. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.005

Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Rufián-Henares, J. Á., Martínez, R. G., Miralles, B., Bergillos, T., Navarro-Alarcón, M., & Jauregi, P. (2017). Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide components. *Food & function*, 8, 2783-2791. DOI: 10.1039/c7fo00666g

National Committee for Clinical Laboratory Standards (US). (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Neduva, V., & Russell, R. B. (2007). Proline-rich regions in transcriptional complexes: heading in many directions. *Science Signaling*, 2007, 1-4. DOI: 10.1126/stke.3692007pe1

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, 250, 4007-4021. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90176-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90176-3).

O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural brain research*, 277, 32-48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027

Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20, 5286-5298. doi: 10.3390/molecules20045286

Phelan, M., Aherne-Bruce, S. A., O'Sullivan, D., Fitzgerald, R. J. & O'brien, N. M. (2009). Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *International Dairy Journal*, 19 (5), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.12.004>

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040

Razak, M. A., Begum, P. S., Viswanath, B., & Rajagopal, S. (2017). Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, Glycine: a review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1716701>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Rocha, T. L., da COSTA, P. H. A., Magalhães, J. C., Evaristo, R. G., de Vasconcelos, E. A. R., Coutinho, M. V., Norma Santos Paes, Maria Cristina Mattar da Silva, & GROSSI-DE-SÁ, M. D. F. (2005). Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Sgarbieri, V. C. (2005). Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8, 43-56. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001>

Spies, J. R. (1967). Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, 39(12), 1412-1416.

Trujillo, A. J., Guamis, B., & Carretero, C. (1997). Proteolysis of goat casein by calf rennet. *International Dairy Journal*, 7(8-9), 579-588. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00063-0)

Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., & Fox, P. F. (2010). Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*, 20(9), 609-629.

White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 8, 170-177. DOI: 10.1155/S1463924686000330

Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J. & Yin, Y. (2013). Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino acids*, 44, 1107-1113. doi: 10.1007/s00726-012-1444-2

Table 1: Amino Acid Composition in Casein Fraction (FCN) in mg/g protein.

AMINO ACIDS	mg/g of protein	FAO/OMS Standard		Scores	
		Childs	Adults	Childs	Adults
		1-2anos	>18 anos	1-2anos	>18 anos
Essentials					
Phenylalanine	46.34 ± 0.03	46	38		2.20*
Histidine	22.36 ± 0.37	18	15		1.49
Isoleucine	50.83 ± 0.1	31	30		1.69
Leucine	81.71 ± 0.09	63	59		1.38
Lysine	76.49 ± 0.06	52	45		1.69
Methionine	27.17 ± 0.02	25	22		1.28**
Threonine	53.85 ± 0.00	27	23		2.34
Tryptophan	8.65 ± 0.01	7	6		1.44
Valine	71.43 ± 0.03	41	39		1.83
Non-essentials					
Arginine	31.90 ± 0.08				
Aspartic acid	70.21 ± 0.09				
Glutamic acid	219.27 ± 0.11				
Alanine	22.03 ± 0.02				
Cysteine	1.14 ± 0.01				
Glycine	12.48 ± 0.02				
Proline	111.6 ± 0.10				
Serine	55.07 ± 0.02				
Tyrosine	37.41 ± 0.03				

Note: * Phenylalanine + Tyrosine; **Methionine + Cysteine.

Table 2 – Values obtained for the minimum inhibitory concentration of the FCN, HDP and HDT, individually, on the growth of *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp after 24 h of incubation, using the microdilution technique in broth.

Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)			
	FCN	HDP	HDT
<i>S. aureus</i>	500	500	15.625
<i>E. coli</i>	31.25	31.25	250
<i>L. monocytogenes</i>	31.25	31.25	250
<i>Salmonella</i> spp	500	62.5	62.5

Table 3 – Test of the antioxidant capacity of the casein fraction (FCN), protein hydrolyzate pepsin (HDP) and hydrolyzed protein trypsin (HDT) by three different methods.

TEST	SAMPLES		
	FCN	HDP	HDT
FRAP	4.52 ^a ± 0.35	10.65 ^b ± 0.73	7.52 ^{ab} ± 1.05
ABTS	5.7 ^a ± 0.02	9.43 ^b ± 0.01	14.75 ^c ± 0.01
DPPH	1.15 ^a ± 0.01	1.83 ^a ± 0.03	1.78 ^a ± 0.01

The results were expressed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ± standard deviation (ANOVA, Tukey's test).

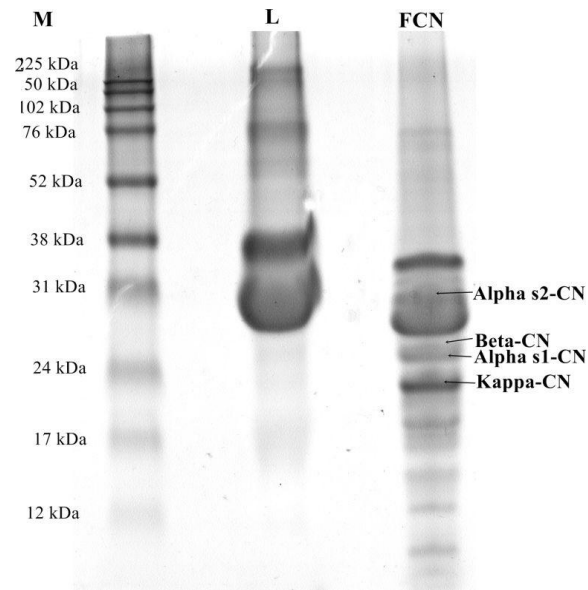


Figure 1: PAGE-SDS of goat milk, collected from animals with 120 ± 2 days of lactation, and casein fraction, obtained by isoelectric precipitation of goat milk, at pH 4.1, showing the protein variants of caseins. **M**: Molecular marker; **L**: Milk; **FCN**: Casein fraction showing caseins α s1 (Alpha s2-CN), α s2 (Alpha s2-CN), β (Beta) and κ (Kappa).

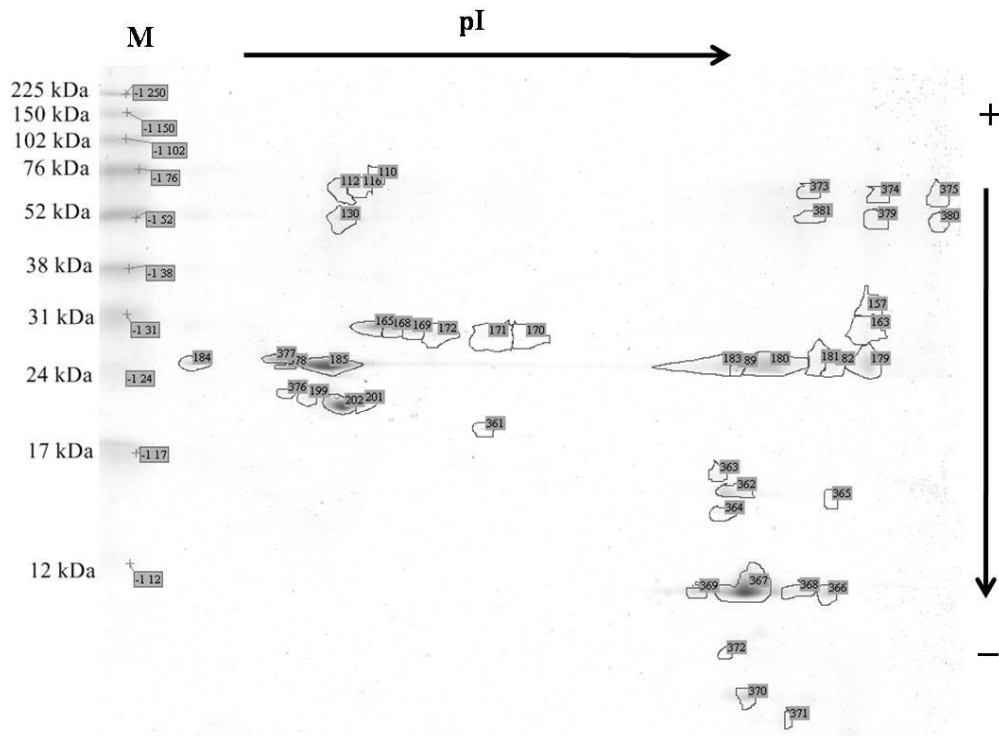


Figure 2: Two-dimensional electrophoresis of caprine milk obtained by isoelectric precipitation of goat milk, at pH 4.1, collected from animals with 120 ± 2 days of lactation. The gel shows the molecular mass (kDa) and the targeting at pH 3 – 11.

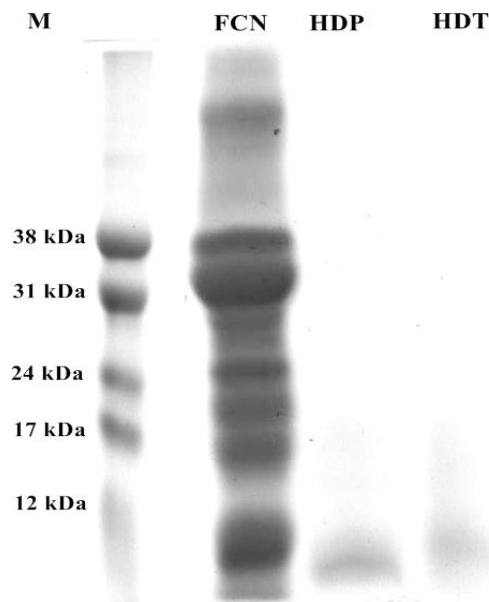


Figure 3: SDS-PAGE-Tricine from the FCN and its hydrolyzates. **M** - Molecular marker; **FCN** - Casein fraction obtained by isoelectric precipitation of goat milk, at pH 4.1, collected from animals with 120 ± 2 days of lactation; **HDP** - Hydrolyzate of the FCN with pepsin (1:50 - E:S; v/v), at 39 °C, 2 h incubation; **HDT** - hydrolyzed FCN hydrolysis with trypsin (1:50 - E: S; v/v) at 39 °C, 2 h incubation.

4.3 PATENTE 1: PRECIPITADO PROTEICO DE LEITE CAPRINO COMO AGENTE ANTINOCICEPTIVO E USO ANALGÉSICO

RESUMO

Refere-se a presente solicitação de patente de invenção ao uso da fração caseínica adquirida por um método de obtenção de um concentrado proteico bioativo em pó de caseínas (fração caseínica) de leite caprino por meio de precipitação isoelétrica em pH 4,1; separação das proteínas dos agentes químicos utilizando membranas de celulose (*cutt-off* 14 kDa) ou gel de filtração e concentração das mesmas por liofilização, *spray dry* ou secagem até 80 °C, para ser usado como agente antinociceptivo na articulação têmporo-mandibular. A fração caseínica abrange um grupo de proteínas lácteas, compostos bioativos relacionados com propriedades anti-inflamatórias, que apresenta a vantagem de ser de fácil acesso, o que promoverá o uso de produtos naturais no tratamento de enfermidades, alinhado à economia e valorização do leite de cabra, principalmente na região Nordeste do Brasil, que abriga a maior porcentagem do efetivo caprino nacional.

4.4 PATENTE 2: HIDROLISADO DA FRAÇÃO CASEÍNICA DE LEITE CAPRINO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

RESUMO

A presente invenção refere-se a um hidrolisado proteico em pó da fração caseínica de leite caprino obtido por hidrólise enzimática sequencial *in vitro* com atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, agentes etiológicos de infecções em seres humanos e resistentes a antibióticos. Para obtenção dos hidrolisados, a fração caseínica liofilizada foi obtida a partir de leite caprino é solubilizada em água destilada e tem o pH ajustado para 2,0. A solução é aquecida em água fervente por 5 minutos e filtrada em filtro de 0,22 µm para a esterilização de microrganismos e incubada com pepsina a 37 °C, na proporção 1:50 (enzima-substrato, m/m), durante 30 minutos, sob agitação de 150 rpm. Ao término dos 30 minutos, a amostra teve seu pH ajustado para 8,0 e a tripsina adicionada. A amostra foi incubado por mais 1 h, sob agitação de 150 rpm. Findos os 60 minutos, a reação foi inativada por aquecimento a 85 °C, durante 15 minutos, seguido do resfriamento do sistema em banho de gelo. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante, dialisado em membrana de celulose 500 Da e em seguida liofilizado. Os

hidrolisados proteicos de caseína um produto natural com alta disponibilidade, baixo custo e hipoalergênico, de fácil obtenção, podendo ser usado no tratamento de infecções bacterianas e alinhado à economia e a valorização do leite de cabra, principalmente no Nordeste do Brasil.

4.5 PATENTE 3: OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DE FRAÇÃO CASEÍNICA E SEU USO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA INFECÇÕES PROVOCADAS POR *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* E *Escherichia coli*

RESUMO

A presente invenção refere-se a um hidrolisado proteico da fração caseínica de leite caprino obtido por hidrólise enzimática *in vitro* com a enzima pepsina, e seu uso como agente antimicrobiano frente às bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* e *Escherichia coli*, agentes etiológicos de infecções em seres humanos e resistentes a antibióticos. Para obtenção do hidrolisado, a fração caseínica liofilizada obtida a partir de leite caprino é solubilizada em água destilada e tem o pH aferido para 2,5. A solução proteica é incubada com solução de pepsina a 39 °C, na proporção 1:50 (enzima-substrato, v/v), durante 2 h, 150 rpm. Ao término desse tempo, a reação é inativada por aquecimento a 85 °C, durante 15 minutos, seguido do resfriamento do sistema em banho de gelo. O sistema é centrifugado e o sobrenadante, dialisado em membrana de celulose 500 Da. O dialisado, equivalente ao hidrolisado, é dialisado e liofilizado. O hidrolisado permitirá o uso de produtos naturais no tratamento de infecções bacterianas, alinhado à economia e valorização do leite de cabra, principalmente no Nordeste do Brasil.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fração caseínica de leite caprino é rica em proteínas e sofre alterações no perfil proteico ao longo da lactação, de acordo com a necessidade nutricional do filhote, sendo que algumas proteínas encontradas, principalmente na fração do leite maduro, podem expor novas abordagens biotecnológicas como o potencial anticancerígeno.

Novos locais de fosforilação nas caseínas e na osteopontina foram identificados e podem contribuir para a compreensão da influência das modificações pós-traducionais na imunorreatividade dos epítomos de IgE que afetam a alergenicidade do leite de cabra.

A fração caseínica de leite caprino do leite maduro possui dezoito dos vinte aminoácidos proteicos, sendo os mais elevados teores o ácido glutâmico e prolina. Além de compor as proteínas, os aminoácidos podem executar outras funções para o bom funcionamento do organismo.

A hidrólise das proteínas da fração das caseínas do leite maduro, com as enzimas pepsina e tripsina, produz peptídeos com propriedades antimicrobianas frente às cepas *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp; e antioxidantes, reduzindo o Fe^{3+} e sequestrando os radicais ABTS e DPPH, oferecendo uma oportunidade importante para sua aplicação para fins terapêuticos e/ou alimentícios.

Os próximos avanços serão os realizar o sequenciamento dos hidrolisados e identificar outras atividades biológicas para a fração caseínica e para os peptídeos gerados, para que possamos entender seus mecanismos de ação.

ANEXOS

ANEXO A: Comprovantes de submissão dos artigos

Your co-authored submission

 The Journal of Nutritional Biochemistry <Evisupport@elsevier.com>
 Sex, 22/03/2019 16:28
 Para: paulabio05@hotmail.com

Dear Dr. Perazzo,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: The Journal of Nutritional Biochemistry

Title: Comparative proteomic profiling of goat milk casein fractions over lactation

Corresponding Author: Tatiane santi gadelha

Co-Authors: Thalles Lacerda, Paula Perazzo

Tatiane santi gadelha submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JNB

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

Track your recent Co-Authored submission to FOODCHEM

 Food Chemistry <eeserver@eesmail.elsevier.com>
 Qui, 21/03/2019 15:09
 Você

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Paula Barbosa,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Food Chemistry

Title: PROTEOMIC AND POTENTIALITIES OF PROTEINS AND PEPTIDES OF CASEIN FRACTION OF GOAT MILK

Corresponding Author: Tatiane santi gadelha

Co-Authors: Paula Barbosa; Thaís Carneiro; Maristela Alcantara; Luciano Pinto; Maria Pacheco; Ângela Cordeiro; Carlos Gadelha;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/foodchem/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Paula&lname=Barbosa&email=paulabio05@hotmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/foodchem/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=paulabio05@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at santi.t@dbm.ufpb.br;santi.tatiane@gmail.com.

ANEXO B: Comprovante de cadastro de acesso ao Patrimônio Genético



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A92C05B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A92C05B**
 Usuário: **Universidade Federal da Paraíba**
 CPF/CNPJ: **24.098.477/0001-10**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Capra hircus

Capra hircus

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **ANALISE PROTEICA, DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO SORO E DO LEITE CAPRINO E SEUS DERIVADOS, COM ÊNFASE NAS FASES DE LACTAÇÃO**

Equipe

Tatiane santi gadelha	Universidade Federal da Paraíba
PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA	Universidade Federal da Paraíba
HELLÍADA VASCONCELOS CHAVES	Universidade Federal do Ceará
Carlos Alberto de Almeida Gadelha	Universidade Federal da Paraíba

MIRNA MARQUES BEZERRA BRAYNER	Universidade Federal do Ceará
VICENTE DE PAULO TEIXEIRA PINTO	Universidade Federal do Ceará
GERARDO CRISTINO FILHO	Universidade Federal do Ceará
DANIELLE ROCHA DO VAL	Universidade Federal do Ceará
FELIPE DANTAS SILVEIRA	Universidade Federal do Ceará
JOANNA TRYCIA MAGALHÃES ALEXANDRE	Universidade Federal do Ceará
ELLEN LIMA DE ASSIS	Universidade Federal do Ceará
ARIELY MARQUES OLIVEIRA DE MENESES	Universidade Federal do Ceará
SEBASTIÃO CARLOS DE SOUSA OLIVEIRA	Universidade Federal do Ceará
ISABELLE MARIA BRANDÃO PAULA	Universidade Federal do Ceará
THAÍS SUSANA MARINHO CARNEIRO	Universidade Federal da Paraíba
JOANDERSON PEREIRA CÂNDIDO DA SILVA	Universidade Federal da Paraíba
MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS	Universidade Federal da Paraíba
LUCIANO DA SILVA PINTO	Universidade Federal de Pelotas
VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA	Universidade Federal da Paraíba
SAMANTHA DE OLIVEIRA LIMA	Universidade Federal da Paraíba
EDSON ALEXANDRE DO NASCIMENTO SILVA	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

07.272.636/0001-31 / Universidade Federal do Ceará

92.242.080/0001-00 / Fundação Universidade Federal de Pelotas

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Eletronico**

Data do Cadastro: 25/02/2019 15:54:32

Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 15:54 de 25/02/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN

ANEXO C: Carta do CEUA/UFC/Sobral/CE



Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Conte, Maurocílio Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de caseínas do leite, de peptídeo hidrolisado de uma caseína do leite e de frações do soro de *Capra hircus* em ensaio pré-clínico de hipernocicepção na ATM de ratos**, registrada com o n° 05/17, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Helianda Vasconcelos Chaves** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 04/07/2017.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/07/2017 até 20/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogêneo <i>Wistar</i>
Nº de animais	336
Peso/Idade	180-220g/2-4 meses
Sexo	336 ♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 20 de julho de 2017.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA