

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO E BIOPROSPECÇÃO
DO SORO DO LEITE DE CABRA CONCENTRADO E
HIDROLISADO

JOÃO PESSOA – PB

2018

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO E BIOPROSPECÇÃO
DO SORO DO LEITE DE CABRA CONCENTRADO E
HIDROLISADO

Dissertação apresentada à banca
examinadora como parte dos requisitos
obrigatórios para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a TATIANE SANTI GADELHA

JOÃO PESSOA-PB
2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C198i Campos, Maria Isabel Ferreira.
IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO E BIOPROSPECÇÃO DO
SORO DO LEITE DE CABRA CONCENTRADO E HIDROLISADO /
Maria Isabel Ferreira Campos. - João Pessoa, 2019.
102 f. : il.

Orientação: Tatiane Santi-Gadelha.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. atividade biológica. 2. caprino. 3. subproduto. 4.
proteômica. 5. peptídeos. I. Santi-Gadelha, Tatiane.
II. Título.

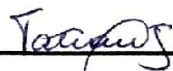
UFPB/BC

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO E BIOPROSPECÇÃO DO SORO DO LEITE
DE CABRA CONCENTRADO E HIDROLISADO

Dissertação Aprovada em 10/04 /2018

BANCA EXAMINADORA



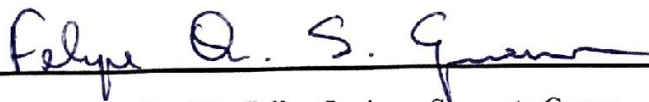
Profª Drª Tatiane Santi Gadelha – PPGCTA/UFPB

Orientadora



Profª Drª Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Membro Interno



Prof Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra

Membro Externo

Profª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Membro Externo

Ao meu Avô (*in memoriam*) e à
minha Mãe, os principais
incentivadores da minha vida
acadêmica, sem o esforço deles em
me educar para almejar sempre mais
nada poderia ter sido feito.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar possível a realização desse sonho, me sustentar nos momentos difíceis e me fazer confiar que o tempo da colheita sempre chega para aqueles que plantam. Sem a sua fortaleza nada poderia ter se concretizado.

Agradeço à minha mãe por entender a minha ausência e me dar sempre todo o apoio para as minhas escolhas, todos os meus sonhos também são dela e apesar das adversidades que enfrentamos pelo caminho nada nos abala diante do milagre que é poder tê-la em minha vida.

A Bruno Magalhães, meu namorado, amigo e companheiro, que inúmeras vezes me ajudou durante essa pesquisa, que respeitou as minhas necessidades e sempre me deu todo o suporte nesta caminhada, seja nas idas noturnas a UFPB ou suportando comigo o que eu não parecia suportar sozinha. Amo você da 1º semana de aula e além.

A minha família, em especial a minha irmã, Maria Antônia e a meu tio José Ney por serem sempre portos seguros.

Agradeço a minha orientadora, a prof Tatiane Santi Gadelha que me acolheu quando caí de paraquedas em seu laboratório e me ensinou muito além de análises e pesquisa. Minha gratidão imensurável a senhora por me fazer ver sempre a luz no fim do túnel e me fazer acreditar em mim sempre.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado. E ao IDEP-Instituto Superior de Desenvolvimento Profissional por financiar parte desta pesquisa e ao CNPQ pelo financiamento do projeto.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba por me acolher como aluna desde a graduação.

Aos meus amigos de laboratório em especial a Joanderson, Julia e Karol. Assim como a Thais, Samantha Lima, e Paula Perazzo obrigada por aparecerem em minha vida quando eu mais me senti sozinha. Vocês foram essenciais nessa caminhada, tornando os dias no laboratório divertidos e produtivos ao mesmo tempo. Obrigada por aguentarem meus supostos “gritos” assim como sempre me fazerem bem quando estão por perto.

Aos professores que ajudaram na condução dos experimentos em especial ao professor Carlos Alberto Gadelha e ao prof Luciano Pinto.

Aos meus parceiros de caminhada espiritual: O FIAT, o ministério do amor que trouxe a palavra de Deus e o conforto amigo todas as quartas-feiras renovando a minha energia para seguir a caminhada. E ao meu círculo do EJC o VermelhOrar por trazer o significado de irmandade em Cristo na minha vida e me fazer sentir amada, vocês são elementos essenciais para a edificação da minha fé, do meu amor e da minha espiritualidade.

Aos meus companheiros de turma de mestrado, em especial a José Honório e a Winnie Alencar por terem compartilhado dos mesmos desafios, e ainda assim permanecerem sempre ao meu lado, sempre oferecendo apoio e conforto. Muito bom saber que posso contar sempre com vocês.

As minhas amigas de sempre Sara, Ana letícia, Carol, Agnes e Letícia por serem presentes sempre apesar da distância e sempre estarem ao meu lado.

Aos amigos Yunna, Alberto, Gabriela, Amandinha, Hassler, Igor, Milena, Renatinha, Ana Paula, Mayra, Eduardo, Fabrícia, Karol, e Guilherme que cada um a sua forma, me deram apoio, carinho e compreensão durante essa jornada.

Aos funcionários do DBM, Dona Geralda, Sr Bosco, Sr Bené, Regina dentre outros por todos os serviços prestados de forma tão solícita e sempre ajudarem de bom coração.

A todos aqueles que alguma vez durante a condução dos meus experimentos trocou a água da minha diálise, Bruno, Yunna, Dani, Joanderson, Julia, David, Paula, Samantha. Um simples gesto vale muito pra quem precisa.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma, desde um simples gesto ou palavra amiga até sendo braços direitos na condução dos experimentos me ajudaram a concluir este trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O soro do leite é um subproduto lácteo usualmente descartado pela indústria ocasionando poluição ao ambiente, sendo assim necessárias alternativas que proporcionem sua reutilização. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi concentrar as proteínas do soro do leite caprino, quantificar estas, identifica-las, avaliar sua capacidade antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante e por fim realizar a hidrólise das mesmas com as enzimas pepsina e tripsina a partir de um planejamento experimental fatorial do tipo 2² e analisar a capacidade antioxidante dos melhores tratamentos. O soro do leite foi obtido por precipitação isoelétrica, filtrado, dialisado e liofilizado obtendo-se assim a proteína concentrada. A quantificação das proteínas foi realizada para proteínas totais e solúveis pelo método de Kjeldahl e Bradford, respectivamente. A identificação das proteínas foi realizada por eletroforese SDS-PAGE e a avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição frente aos micro-organismos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* pelo método de microdiluição. A atividade antiproliferativa foi realizada frente à linhagem A375 correspondente a células de melanoma maligno humano. Os hidrolisados foram obtidos a partir da hidrólise enzimática das proteínas do soro utilizando as enzimas pepsina e tripsina em diferentes valores de pH e tempo, enquanto o grau de hidrólise foi medido através do método de Ortoftaldeído. Aqueles que apresentaram os melhores valores de grau de hidrólise foram avaliados quanto ao perfil proteico através de eletroforese Tricina SDS-PAGE e foram testados quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS e comparados quanto a atividade antioxidante da proteína nativa. Os experimentos de atividade antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente utilizando a análise de variância ANOVA e o pós-teste de Dunnet. Os resultados mostraram a identificação no soro do leite concentrado de uma mistura heterogênea de proteínas, sendo possível visualizar alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, lactoferrina, dentre outras. Com relação à atividade antibacteriana a concentração inibitória mínima do soro do leite para cada microrganismo foi diferente, obtendo-se valores que variaram na faixa de 120 a 30µg/mL de proteína. Em relação a inibição da proliferação de células cancerígenas os resultados apontam o valor máximo de 66%, para 24h de exposição. Com relação a hidrólise destas proteínas, a partir da análise estatística foi observado que o tempo e a combinação entre tempo e pH foram os parâmetros que exerceram maior efeito sob o grau de hidrólise dos experimentos. Os valores máximos obtidos de hidrólise da proteína do soro são de aproximadamente 35%. Para estes tratamentos pode se observar que o perfil peptídico e a atividade antioxidante possuem diferenças quando comparado à proteína nativa mostrando que a hidrólise pode gerar peptídeos bioativos capazes de desempenhar atividade antioxidante. Por fim, os resultados sugerem que o soro do leite de cabra é uma importante matriz funcional que possui uma composição proteica de bastante interesse e aplicabilidade exercendo potenciais atividades biológicas e assim podendo ser reaproveitado a fim de obter-se peptídeos bioativos.

Palavras-chaves: atividade biológica; caprino; subproduto; proteômica; peptídeos.

ABSTRACT

Whey is a milk by-product usually discarded by the industry causing pollution to the environment, and therefore alternatives are needed to provide reuse. Thus, the objective of this study was to concentrate goats' milk proteins, quantify them, identify them, evaluate their antibacterial, antiproliferative and antioxidant capacity and finally carry out the hydrolysis of the proteins with the enzymes pepsin and trypsin from a experimental planning of type 2² and to analyze the antioxidant capacity of the best treatments. The whey was obtained by isoelectric precipitation, filtered, dialysed and lyophilized, thus obtaining the concentrated protein. Protein quantification was performed for total proteins and soluble by the method of Kjeldahl and Bradford, respectively. The identification of the proteins was performed by SDS-PAGE electrophoresis and the evaluation of the antibacterial activity was performed by microdilution method against the microorganisms *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* by the method of micro dilution. Antiproliferative activity was performed against the A375 line corresponding to human malignant melanoma cells. Hydrolysates were obtained from the enzymatic hydrolysis of serum proteins using the enzymes pepsin and trypsin at different pH and time values, while the degree of hydrolysis was measured by the Ortofitaldehyde method. Those that presented the best values of degree of hydrolysis were evaluated for the protein profile through Tricine SDS-PAGE electrophoresis and were tested for antioxidant activity by the DPPH and ABTS method and compared to the antioxidant activity of the native protein. The experiments of antibacterial, antiproliferative and antioxidant activity were performed in triplicate and analyzed statistically using the analysis of variance ANOVA and the Dunnet post-test. The results showed the identification in whey from milk of a heterogeneous mixture of proteins, being possible to visualize alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, lactoferrin, among others. Regarding the antibacterial activity, the minimum inhibitory concentration of the serum of the milk for each microorganism was different, obtaining values that varied in the range of 120 to 30 µg / mL of protein. In relation to the inhibition of the proliferation of cancerous cells the results point the maximum value of 66%, for 24h of exposure. With respect to the hydrolysis of these proteins, from the statistical analysis it was observed that the time and the combination between time and pH were the parameters that had the greatest effect under the degree of hydrolysis of the experiments. The maximum values obtained for hydrolysis of the whey protein are approximately 35%. For these treatments it can be observed that the peptide profile and the antioxidant activity have differences when compared to the native protein, showing that the hydrolysis can generate bioactive peptides capable of performing antioxidant activity. Finally, the results suggest that goat's milk serum is an important functional matrix that has a protein composition of great interest and applicability exerting potential biological activities and thus being able to be reused in order to obtain bioactive peptides.

Keywords: biological activity; by-product; proteomics; residue; peptides..

LISTA DE ABREVIACÕES

ABTS – 2,2'-azino-bis

BHI – *Brain Heart Infusion*

BIOGER – Laboratório de Bioquímica, Genética E Radiobiologia

CCEN – Centro de Ciências Exatas e da Natureza

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

FAO – *Food And Agriculture Organization*

GMP – Glicomacropéptido

HP – Hidrolisado de Pepsina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística

Ig – Imunoglobulinas

IN – Instrução Normativa

kDa - kiloDaltons

LAPROTE – Laboratório de Proteômica Estrutural

LFcin – Lactoferricina

LP – Lactoperoxidase

MAPA – Ministério de Agricultura Pecuária E Abastecimento

OPA – Ortoftaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Ponto Isoelétrico

PPM – Pesquisa Pecuária Municipal

SDS – Dodecyl Sulfato de Sódio

TRIS – Tris-hidroximetil-aminometano

UFPB – Universidade Federal Da Paraíba

α -La – α -lactoalbumina

β -Lg – β -lactoglobulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Etapas envolvidas no processo de pesquisa de peptídeos bioativos do soro do leite	38
Figura 2 Fluxograma das etapas experimentais	45
Figura 3 Fluxograma de obtenção do soro	46
Figura 4 Fluxograma de caracterização proteica do soro	47

ARTIGO 1

Figure 1. Analysis of a pool of goat milk whey proteins by SDS-PAGE gel electrophoresis (A) contains the profile of molecular mass markers in (B) whey proteins goat where IG (immunoglobulin), LF (lactoferrin), LP (lactoperoxidase), albs (serum albumin), proteoses peptone (PrP) β -lg (Beta lactoglobulin) and α -La (alpha lactalbumin)	69
---	----

ARTIGO 2

Figura 1 Perfil peptídico das amostras de soro de leite caprino obtido pela ação das enzimas pepsina e tripsina por 120 min. A: Hidrolisados de pepsina por 120 mins; B: Hidrolisados de tripsina por 120 mins; C: marcador de massa molecular.	89
---	----

Figura 2 Atividade antioxidante dos hidrolisados testados em diferentes concentrações pelo método ABTS. (A) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando pepsina sob condições de pH 2,5/ 150 min. (B) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando pepsina (HP) sob condições de pH 2/ 120 min. (C) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 6,5/ 150 mins. (D) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 7/ 120 mins. (E) Atividade antioxidante do soro do leite caprino concentrado. Os resultados são comparados com o controle positivo. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de comparações pelo teste de Tukey onde $p < 0,0001$	91
--	----

Figura 3 Atividade antioxidante dos hidrolisados testados em diferentes concentrações. (A) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando pepsina sob condições de pH 2,5/ 150 mins. (B) Atividade antioxidante do Hidrolisado utilizando pepsina sob condições de pH 2/ 120 mins. (C) Atividade antioxidante do Hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 6,5/ 150 mins. (D) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 7/ 120 mins. (E) Atividade antioxidante do soro do leite caprino concentrado. Os resultados são comparados com o controle positivo. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de comparações pelo teste de Tukey onde $p < 0,0001$	92
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Efetivo de rebanho caprino no Brasil no período de 2012-2016	20
Quadro 2 Composição centesimal soro do leite ácido e doce	24
Quadro 3 Características químicas e físicas das proteínas do soro do leite	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Níveis reais e codificados dos parâmetros do processo para hidrólise do soro leite de cabra, com a utilização de pepsina como enzima proteolítica 48

Tabela 2 Níveis reais e codificados dos parâmetros do processo para hidrólise do soro do leite de cabra, com a utilização de tripsina como enzima proteolítica 48

ARTIGO 1

Table 1 Minimum Inhibitory Concentration - MIC and% inhibition of whey from goat milk 70

Table 2 Cell proliferation inhibition values by time and concentration 76

ARTIGO 2

Tabela 1 Planejamento estatístico dos hidrolisados do soro do leite caprino 85

Tabela 2 Grau de hidrólise dos diferentes tratamentos de hidrólise das proteínas do soro do leite de cabra 88

LISTA DE GRÁFICOS

- Graphic 1 Antibacterial activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Salmonella* spp. Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the Dunnet Test application. 71
- Graphic 2 Antibacterial Activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Escherichia coli* HSL1. Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the Dunnet Test application. 71
- Graphic 3 Antibacterial Activity whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Listeria monocytogenes*. Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the Dunnet Test application. 72
- Graphic 4 Antibacterial Activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against different strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 23235(A), 912415D (B) and 27664D (C) Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the application of the Dunnet Test. 73
- Graphic 5 Antibacterial Activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Pseudomonas aeruginosa* HS12. Statistically significant differences were observed when $p < 0.05$ from Dunnet's test. 74
- Graphic 6 Antiproliferative activity of whey from goat's milk concentrated against human malignant melanoma cells lineage A375 for 72 hours. The differences were statistically accepted when $p < 0.05$ from the Tukey test. 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 CAPRINOCULTURA.....	19
2.1.1 LEITE DE CABRA, COMPOSIÇÃO E ASPECTOS NUTRICIONAIS.....	20
2.2 SORO DO LEITE.....	23
2.3 PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	27
2.3.1 β -lactoglobulina	28
2.3.2 α -lactoalbumina	29
2.3.3 Imunoglobulinas	30
2.3.4 Albumina Sérica	30
2.3.5 Lactoperoxidase	31
2.3.6 Proteoses e peptonas.....	31
2.3.7 Lactoferrina	32
2.3.8 Macropeptídeos de Caseína	32
2.4 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DAS PROTEÍNAS DO SORO.....	33
2.5 HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	34
2.6 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO SORO	37
2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	39
2.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	41
2.9 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTITUMORAL.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO.....	45
3.2 OBTENÇÃO DO LEITE E PREPARO DO SORO CAPRINO	45
3.3 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DO SORO.....	46
3.3.1 Determinação do teor proteico solúvel	46
3.3.2 Determinação do teor protéico total	46
3.3.3 Eletroforese SDS-PAGE	46

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA <i>in vitro</i> DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE CAPRINO.....	47
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO	48
3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina.....	48
3.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	49
3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
3.8 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>in vitro</i>	50
3.9 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE.....	51
3. 10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
REFERÊNCIAS	52
5 RESULTADOS	64
ARTIGO 1	64
ARTIGO 2	82
PATENTE	95
CAPÍTULO DE LIVRO	96
6 CONCLUSÕES	100
ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO

Os caprinos são mamíferos ruminantes e herbívoros foram um dos primeiros animais a serem domesticados na história da humanidade, e a partir destes os povos antigos faziam a utilização da fibra, couro, leite e carne. Outro aspecto importante a ser considerado é a facilidade de adaptação às condições climáticas desse animal que pode mudar seus hábitos alimentares dependendo da biodisponibilidade de alimento (BRASIL,2000).

No Brasil a criação de caprinos é favorecida pelo clima semiárido e pela vegetação da Caatinga, ambos característicos da Região Nordeste do Brasil. E esta região apresenta a maior concentração do rebanho caprino nacional, sendo a Paraíba o Estado com o 5º maior rebanho e o maior produtor de leite caprino, visto que nos outros Estados do Nordeste a criação de cabras é mais destinada ao comércio da carne e do couro do animal (IBGE, 2016).

O leite de cabra quando comparado aos demais leites se caracteriza por sua elevada digestibilidade, presença de proteínas de alto valor biológico e menor alergenicidade influenciando de maneira positiva nas condições fisiológicas do indivíduo que o consome, proporcionando uma vida mais saudável (LOPES, 2012)

A utilização do leite caprino não se limita ao leite *in natura*, diversos tem sido os produtos desenvolvidos a exemplo de iogurtes, bebidas lácteas e a sua utilização mais frequente tem sido voltada para produção de diferentes tipos de queijos.

A produção de queijo caprino tem destaque a nível mundial, sendo este considerado como um queijo rico em sabor e que apresenta alto valor nutricional. Entretanto, a produção de queijos acarreta em um sério problema ambiental: a elevada produção do resíduo, denominado soro do leite, um subproduto que na maioria das vezes é lançado ao solo ou a água sem critérios técnicos acarretando a poluição do meio ambiente (BARBOSA, 2010).

Dessa forma, percebe-se a necessidade de estabelecer sistemas de utilização do soro do leite que possam reduzir os impactos ambientais negativos, uma vez que o tratamento antes do descarte gera para os pequenos produtores um gasto que não compensa a produção e às indústrias um custo adicional que elevaria o preço do produto final, o queijo.

Devido a esta problemática e a necessidade cada vez mais eminente de gerar alternativas a partir de subprodutos de descartes, é que as instituições de pesquisa tem se dedicado ao estudo das potencialidades e do reaproveitamento do soro do leite, impedindo assim o seu descarte incorreto e custos adicionais com o tratamento. Diante do relato de resultados promissores, do elevado valor nutricional e da presença de proteínas de alto valor

biológico, vem se ampliando assim o leque de possibilidades de reutilização do soro pela indústria de alimentos.

Com relação a sua composição, o soro do leite retém uma porcentagem dos nutrientes presentes no leite, principalmente no que diz respeito aos carboidratos e proteínas. Estas tem importância expressiva, tanto no que se refere à qualidade como a quantidade da proteína, pois possuem todos os aminoácidos essenciais e estão presentes em quantidade análoga ou superiores as recomendadas pela *Food And Agriculture Organization* (FAO) (DÍAZ-CASTRO, 2015).

O estudo das proteínas do soro do leite têm se destacado ao longo dos anos por estas apresentarem diferentes funcionalidades, exercendo efeitos fisiológicos importantes em diversos sistemas do organismo. Dentre estes efeitos biológicos podem ser citados o potencial funcional imunomodulatório, antibacteriano, antioxidante, opióide, antiproliferativo, anti-colesterolêmico, anti-hipertensivo dentre outros efeitos menos elucidados pela literatura (YADAV, 2015).

A característica funcional das proteínas do soro do leite se relaciona com o reaproveitamento do soro a nível industrial, para elaboração de produtos com caráter funcional ou nutracêutico. Dessa forma há a necessidade de pesquisas que explorem suas funcionalidades e que possam esclarecer o mecanismo de ação pelo qual estas proteínas conseguem exercer sua atividade.

No âmbito da tecnologia de alimentos as proteínas do soro tem aplicabilidade importante e a depender do processamento aos quais estas serão submetidas podem ocorrer alterações nos efeitos funcionais dessas moléculas. A otimização da obtenção de hidrolisados proteicos do soro do leite caprino além de obter uma melhor execução do processamento e assim melhores rendimentos, visa possibilitar o ajuste de determinados parâmetros para alcançar peptídeos com uma maior excelência em desempenho biológico (ALVES, M. P. et al., 2014).

Diante do exposto, observa-se a necessidade de estudos que possam aperfeiçoar a produção de bioativos e dessa forma potencializar as suas atividades biológicas, podendo bioprospectar as proteínas do soro do leite com base na sua atividade funcional. O presente trabalho objetivou caracterizar o perfil proteico, aperfeiçoar as condições de obtenção da proteína hidrolisada e avaliar as possíveis atividades biológicas tanto das proteínas quanto do hidrolisado proteico do soro do leite caprino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CAPRINOCULTURA

Caprinocultura é a atividade agropecuária relacionada à criação de cabras, tanto em ambiente doméstico como por sistemas de produção mais elaborados. No Brasil, a principal concentração do rebanho caprino, bem como a maior produção do leite acontece na região Nordeste devido à capacidade destes ruminantes se adaptarem melhor ao clima semiárido e da vegetação Caatinga. (BRASIL, 2000)

O manejo por parte dos criadores se adequa aos sistemas de produção agropecuária destes ruminantes, para melhor exploração da atividade leiteira. Dadas essas características a cadeia produtiva do leite influencia no beneficiamento de milhares de famílias que, estimuladas pela geração de renda, apoiam-se na criação e fortalecimento de microempresas rurais deste setor do agronegócio (IBGE, 2016; LOPES, 2012; SILANIKOVE et al., 2010).

A cadeia produtiva de caprinos utiliza os sistemas de produção mistos que são destaque na prática pecuária nordestina devido à criação consorciada de outras espécies de animais. A pequena disponibilidade de terra própria acaba sendo complementada pelo uso de área de pastoreio coletivo, com variação da quantidade e qualidade de pastagem disponível. Portanto, o modelo semiextensivo é o mais utilizado, onde esse consiste em manter os animais a campo, com baixo grau de intervenção e manejo do rebanho, em áreas de pasto nativo. Quando necessário à alimentação suplementar é utilizada, sendo principalmente destinada aos períodos de seca usualmente administrada em cocho (SILVA et al., 2014).

Os dados estatísticos realizados pelo Instituto Brasileiro de geografia e estatística - IBGE a partir da realização anual da Pesquisa Pecuária Municipal - PPM mostra que em 2016 o Brasil possuía um rebanho caprino de 9.780.533, onde a região nordeste detém aproximadamente 93% do rebanho nacional (BRASIL, 2016).

Ainda de acordo com a PPM, 2016 dentre os Estados da região Nordeste a Paraíba detém o 5º maior rebanho de caprinos onde as regiões paraibanas de maior destaque na caprinocultura são as da Borborema, do Agreste, e do sertão paraibano. Juntas, estas regiões totalizam 98% do rebanho estadual sendo a sub-região do Cariri a que mais se destaca na produção de leite de cabra (BRASIL, 2016).

O quadro a seguir mostra os dados referentes ao quantitativo do rebanho de cabras no Brasil, no Nordeste e na Paraíba nos últimos 5 anos.

Quadro 1 Efetivo de rebanho caprino no Brasil no período de 2012-2016

	2012	2013	2014	2015	2016
Brasil	8.646.463	8.779.213	8.851.879	9.620.877	9.780.533
Nordeste	7.841.373	8.023.070	8.109.672	8.909.076	9.092.724
Paraíba	473.184	478.083	507.589	566.576	566.153

Fonte: IBGE/Pesquisa Pecuária Municipal 2012-2016

Pode ser observado que houve uma queda pequena no quantitativo total de cabeças no ano de 2015 para o ano de 2016, no Estado da Paraíba, porém essa é a primeira vez que os números diminuem desde a primeira vez que foi realizada a PPM em 2011. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA afirma no informativo 114 (30/11/2017) que essa queda nos números é devido ao período de estiagem no Nordeste e do corte de gastos nas ações e políticas públicas voltadas à contenção da mortandade de animais (BRASIL, 2017).

A indústria do leite caprino não limita sua influência apenas a produção e comercialização do leite, pois o conjunto econômico dessa atividade agropecuária engloba em sua maioria pequenas indústrias e cooperativas de laticínios. Observa-se, ainda, uma amplificação das oportunidades do ponto de vista científico ao desenvolvimento de novas pesquisas tendo o leite de cabra, seus produtos e subprodutos como objeto de estudo (YANGILAR, 2013; SILANIKOVE et al., 2010).

2.1.1 LEITE DE CABRA, COMPOSIÇÃO E ASPECTOS NUTRICIONAIS

O leite pode ser definido de diferentes formas na literatura, a definição do ponto de vista da legislação brasileira o MAPA na IN Nº 51 traz que o leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Sua composição varia de acordo com a raça, condições ambientais, estágio da lactação, alimentação, cuidados com o animal, ciclo estral, estado de saúde, idade e quantidade de leite produzido. Para o termo leite, se entende o da espécie bovina. Para todos os leites de outras espécies, esta deve ser denominada a exemplo, leite de cabra, leite de ovelha, leite de jumenta etc. (BRASIL, 2000; ALVES, PINHEIRO, 2005)

Já do ponto de vista biológico, Sgarbieri (2005) afirma que o leite é o produto de secreção das glândulas mamárias, sendo um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. Possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie.

Para o leite de cabra, temos que este é um líquido branco puro, com odor e sabor característicos, quando comparado a outros tipos de leite. É um alimento nutritivo, rico em proteínas de alto valor biológico, com uma demanda energética vantajosa devido à presença do carboidrato lactose e de ácidos graxos de cadeia curta e média. Além disso, apresenta em sua composição micronutrientes importantes em quantidade significativa, tais como cálcio, fósforo, potássio e magnésio, e vitaminas lipossolúveis (A e D) (BUENO, 2005; CAMPOS, 2005).

O leite caprino se destaca dos outros tipos de leites consumidos pela população, devido aos seus aspectos específicos, tais como seus atributos sensoriais marcantes e sua característica nutricional relevante. Tem se observado maior interesse da população em consumir este tipo de leite, em razão da possibilidade do mesmo influenciar de maneira positiva na saúde da população. Diante disso, a indústria de produção de leite de cabra vem procurando desempenhar aspectos dinâmicos e funcionais de maneira a ampliar a cadeia produtiva (YADAV, 2015; LOPES, 2012).

A propósito, o progresso do setor da caprinocultura leiteira engloba uma esfera mundial, pois favorece a economia de diversos países como, por exemplo, a China, a Índia, a França e também o Brasil, uma vez que as múltiplas utilizações que podem ser atribuídas ao leite de cabra perpetuam a sua difusão e consumo sob as mais diversas formas, seja para subsistência, como matéria prima de diversos produtos tais como iogurtes, queijos etc., em uso terapêutico e até em cosméticos (LOPES, 2012).

A composição do leite caprino apresenta variabilidade nos compostos bioquímicos, propriedades tecnológicas e qualidade microbiológica. É um leite mais denso e mais ácido do que o bovino podendo atingir valores de densidade de 1034 g/L. e o teor de acidez variando entre 0,11 e 0,18 °Dornic. (MCCULLOUGH, 2004; HAENLEIN, 2004).

Diversos fatores podem interferir na composição do leite como apresentados por Bolacali; Küçük (2012) em estudo sobre as características do leite produzido por cabras Saanen, a exemplo dos fatores genéticos: raça e espécie; ambientais: clima e solo; das práticas de caprinocultura, sistemas confinado, pasto e misto.

Com relação aos macronutrientes presentes em sua composição algumas particularidades devem ser levadas em consideração. O leite caprino é uma excelente fonte de proteína de alta qualidade, a qual é mais digerível, facilmente absorvida e menos alergênica em comparação a do leite de vaca. Esta última característica se dá devido à menor quantidade da fração alfa-S1 da caseína que possui maior potencial alergênico (MADUREIRA et al., 2017).

A melhor digestibilidade do leite caprino também está ligada ao menor tamanho das esferas de gordura (2-3 μm), ausência da substância aglutinina e maiores teores de ácidos graxos de cadeia média e curta (caprílico - C6:0, capróico - C8:0 e cáprico - C10:0. Como característico dos leites em geral, a lactose é o açúcar predominante neste tipo de leite, e grande parte da sua concentração encontra-se no soro após coagulação (DÍAZ-CASTRO et al., 2015).

A composição proteica do leite caprino é bastante variada sendo esta dividida em dois grandes grupos: proteínas do leite onde as caseínas correspondem a 80% e as proteínas do soro do leite, também chamadas de proteínas solúveis que condizem a 20 % do total (BRANDELLI, DAROIT e CORRÊA, 2015).

As caseínas constituem uma família de fosfoproteínas que variam em tamanho e sequência de aminoácidos. Elas contêm um número variado de radicais fosfatos ligado a resíduos de serina, concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas. Normalmente, as caseínas se encontram na forma de micelas nos quais se tem conhecimento de 5 tipos de caseínas, a alfa-S1, alfa-S2, beta, kapa e gama-caseínas (HARAGUCHI et al., 2006).

Já o soro do leite é constituído por uma maior variedade de proteínas que possuem diferentes características físicas e químicas. As proteínas do soro são classificadas em: majoritárias, a alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina e; as proteínas minoritárias: lisozima, lactoferrina, sérum albumina, proteose peptona, glicomacropeptideo e imunoglobulinas e (SGARBIERI, 2005).

Portanto, características como a elevada digestibilidade, o valor nutricional e a potencial funcionalidade vêm conduzindo ao maior consumo deste leite pela população, bem como impulsionando pesquisas atreladas a este alimento (YANGILAR, 2013). Diante da ampliação da visibilidade deste alimento, o estudo das características químicas e nutricionais do leite caprino possibilita uma relação favorável à aceitação do consumidor tanto pelo leite como pelos seus produtos derivados, o que amplia o desenvolvimento de diversos tipos de produtos a partir do leite de cabra. (YADAV, 2015)

De forma a impulsionar à comercialização dos produtos caprinos as pequenas empresas e cooperativas tem desenvolvido diversos produtos usando como matéria-prima o leite caprino, a exemplo de manteigas, cookies, iogurtes, bebidas lácteas, e a de maior destaque que é a produção de diferentes tipos de queijos a partir do leite de cabra.

Contudo a produção de queijo gera um importante montante de resíduo líquido, denominado de soro do leite que corresponde a cerca de 85% a 95% do volume total de leite. Para se produzir 1 kg de queijo é necessário 10 litros de leite, e o volume produzido de soro após a fabricação do queijo é de aproximadamente 9 litros. Esse contém mais da metade dos sólidos presentes no leite original, incluindo grande parte da lactose, proteínas do soro (20% da proteína total), sais minerais e vitaminas solúveis (BARBOSA et al., 2010; DRAGONE et al., 2009).

2.2 SORO DO LEITE

O soro é caracterizado como um líquido amarelado, devido à presença de riboflavina (vitamina b12), obtido a partir do processo de produção de queijos ou da separação da fração caseínica do leite (SISO, 1996; DE WIT, 2001).

O interesse de pesquisadores e das indústrias de laticínios no soro do leite ocorre devido ao seu elevado valor nutricional, capacidade tecnológica com aplicações industriais e indicações científicas que este pode contribuir de forma benéfica para a fisiologia do corpo e manutenção da saúde (DÍAZ-CASTRO, 2015).

A obtenção do soro do leite se dá a partir de três processos principais: coagulação enzimática, um dos processos mais comumente conhecidos e empregados, que consiste na adição de uma enzima, a qual ocasiona a precipitação de caseínas e separação do soro, esse processo é habitualmente utilizado para a produção de queijos; precipitação ácida, conforme ocorre o abaixamento do pH ao ponto isoelétrico da caseína, essa se torna insolúvel e coagula separando-se assim da fração solúvel a qual é o soro; separação física das micelas de caseína por microfiltração, baseado na diferença de tamanho das caseínas em comparação com as proteínas do soro, embora este processo seja menos comumente empregado devido ao seu alto custo e maior tempo de separação.

Independentemente do processo, irá ocorrer a obtenção de um concentrado de micelas caseínicas e das proteínas do soro. Após a precipitação o volume de soro obtido representa cerca de 90% do volume inicial do leite e no que diz respeito ao aspecto nutricional,

aproximadamente 55% dos nutrientes do leite se encontram presentes no soro (SMITHERS, 2008; KRISSANSEN, 2007; HARAGUCHI et al., 2006; SGARBIERI, 2005).

De modo geral a composição do soro do leite de cabra pode ser apresentada como sendo de 93-94% de água e nutrientes remanescentes do leite sendo, a lactose, proteínas solúveis, minerais, ácidos orgânicos, baixo teor de gordura e de proteínas de membrana do glóbulo de gordura e alguns componentes nitrogenados não proteicos tais como ureia e ácido úrico, além de vitaminas solúveis, em especial as do complexo B. Contudo, podem ocorrer variações na composição do soro, uma vez que está diretamente ligada à composição inicial do leite e os mesmos fatores que afetam a composição do leite irão interferir na característica do soro. (PANESAR et al., 2007).

Outro fator importante relacionado com a composição do soro é o processamento pelo qual este foi obtido, sendo dois tipos principais de processamentos: A coagulação enzimática utilizando a renina, um complexo enzimático industrial contendo quimosina ou outras enzimas de coagulação de caseína, processo no qual o soro produzido é chamado de soro doce, devido a coagulação ocorrer em pH próximo a neutralidade aproximadamente 6,5. (KOSSEVA et al., 2009).

Já quando a coagulação da caseína ocorre pela adição de ácidos ou culturas microbianas que promovem o abaixamento do pH para valores em torno de 4,6 o soro formado é chamado de soro ácido (KOSSEVA et al., 2009). A composição proteica de ambos os soros é semelhante no que se refere à maioria das proteínas. O quadro 2 traz a comparação entre os dois tipos de soro.

Quadro 2 Composição centesimal soro do leite ácido e doce

Componentes	Soro Doce (g/L)	Soro Ácido (g/L)
Sólidos Totais	63.0–70.0	63.0–70.0
Lactose	46.0–52.0	44.0–46.0
Proteína	6.0–10	6.0–8.0
Lipídios	5.0	0.4
Lactato	2.0	6.4
Cinzas	5.0	8.0
Cálcio	0.4–0.6	1.2–1.6
Fosfato	1.0–3.0	2.0–4.5

Fonte: Yadav et al., 2015.

Segundo Paboeuf et al. (2011), há diferenças entre a composição destes dois tipos de soro, pois o soro doce apresenta maior teor de lactose e menor teor de cálcio, uma vez que não há abaixamento do pH e assim os íons de cálcio se associam às caseínas, no queijo. Enquanto que, no soro ácido os menores teores de lactose são devido ao abaixamento do pH, fermentando assim uma fração da lactose e transformando-a durante a coagulação em ácido láctico. Os maiores teores de cálcio e fósforo são devido à solubilização do complexo fosfato de cálcio em pH ácido.

A respeito da sua obtenção em escala industrial, o soro do leite é obtido em grandes volumes pelas indústrias de laticínios, contudo estas indústrias frequentemente descartam esse resíduo de maneira incorreta acarretando assim na poluição ambiental uma vez que a demanda biológica de oxigênio do soro do leite é elevada devido à elevada presença de água e lactose. Ocorrendo assim o desperdício de um produto de elevado valor nutricional e tecnológico (YADAV et al., 2015)

O autor supracitado observa que a perspectiva de reutilizar o soro do leite é fundamentada no crescente interesse científico das suas propriedades nutricionais bem como na potencial funcionalidade dos seus componentes.

Hernández-Ledesma et al. (2011) afirma que a composição do soro do leite proveniente de ovinos e caprinos apresenta particularidades no que diz respeito à capacidade que o soro destas espécies tem de modular a atividade de funções fisiológicas, e ainda ser potencialmente capaz de reduzir o risco de doenças crônicas, atribuindo-se ao soro do leite destes animais, o título de “alimentos funcionais”.

Dentre os constituintes do soro do leite, as proteínas são um dos componentes que exercem importante característica funcional e vêm ganhando cada vez mais notoriedade devido às atividades biológicas as quais são capazes de desempenhar, e com isso culminam por ocasionar a formulação de diversos produtos que possuem propriedades consideradas benéficas à saúde (PESCUMA et al., 2010).

Apesar dos benefícios, da relevância e do alto valor nutricional há limitações na utilização *in natura* do soro do leite devido a sua alta atividade de água que leva a uma significativa perecibilidade e elevada diluição dos seus componentes. Contudo para evitar a perda do produto e da qualidade nutricional, a indústria de alimentos utiliza técnicas de processamento por aquecimento e secagem ou por osmose reversa (evaporação, *spray-drying*, liofilização) gerando um composto concentrado do soro do leite. Outras tecnologias para a obtenção de compostos separados do soro do leite (principalmente proteínas) é o método de separação por membranas (BRANS et al., 2004).

Os processamentos que podem ser realizados no soro do leite, para a obtenção de produtos que agreguem um maior valor tecnológico, podem ser agrupados em dois tipos: O processamento direto do soro, tratamento físico ou térmico, para obtenção do soro do leite em pó, concentrado de proteína de soro do leite, proteína isolada de soro do leite, lactose, e outras frações. E o segundo engloba a utilização de biotecnologias onde o soro é utilizado como substrato para diversos processos microbianos e/ou enzimáticos para obtenção de produtos finais com elevado valor biológico, nutricional e tecnológico (MOLLEA et al., 2013; PANESAR et al., 2013; PRAZERES et al., 2012; KOSSEVA et al., 2009).

Dentre os constituintes do soro, o maior destaque nas pesquisas e na utilização em escala industrial são as proteínas, uma vez que são aplicadas na indústria de alimentos devido a suas excelentes propriedades funcionais correlacionadas às suas características físicas, químicas, estruturais e nutricionais (JOVANOVIĆ et al., 2005).

O crescente aumento das pesquisas envolvendo a purificação das proteínas do soro possibilitou o desenvolvimento de processos tecnológicos utilizados para separação ou fracionamento das proteínas individuais do soro dentre eles: a precipitação / floculação por tratamento térmico ou usando polímeros; a tecnologia de membrana (ultrafiltração e nanofiltração); a separação cromatográfica e combinação dessas tecnologias (YADAV et al., 2015).

O interesse da indústria de alimentos nas propriedades tecnológicas das proteínas do soro é baseado nas características químicas e estruturais destas proteínas, podendo estas serem empregadas como agentes espessantes, emulsificantes, geleificantes dentre outras. As principais utilizações das proteínas do soro do leite foram resumidas abaixo a partir do que foi descrito por Yadav et al. (2015)

Para os produtos lácteos, podem ser utilizadas em queijos para melhorar a formação do coágulo, como estabilizante em iogurtes. Já para produtos cárneos são utilizadas como texturizador e extensor e para estabilizar emulsões de processados cárneos como salsichas. Em produtos de padaria, confeitaria, carnes e frutos do mar para obtenção de um gel forte, (originado devido à interação das proteínas) com alta capacidade de retenção de água ou ainda como agentes espumantes por induzirem a formação da espuma baixando a tensão interfacial, propriedade atrativa para muitos produtos como bolos, *milk shakes*, sobremesas congeladas e coberturas batidas.

Outra utilização bastante popular das proteínas do soro do leite é para formulação de bebida à base de proteína do soro, pronta para consumo, que fornece alto teor proteico, visando especialmente a utilização em dietas com maiores teores de proteína.

A seguir será discutida cada proteína constituinte do soro do leite, bem como suas propriedades físicas e químicas.

2.3 PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

As proteínas do soro do leite caprino em sua maioria são sintetizadas na glândula mamária do animal e sua composição proteica quantitativa indica que ele é uma mistura heterogênea de diferentes proteínas individuais, onde cada uma apresenta diferenciação nas propriedades funcional, fisiológica e nutracêuticas. (YADAV et al., 2015)

De maneira geral as proteínas do soro do leite são divididas em dois diferentes grupos, sendo proteínas majoritárias e proteínas minoritárias. No grupo das proteínas majoritárias estão incluídas a β -lactoglobulina (Lg), que é a proteína de maior concentração no soro, seguida pela lactoalbumina (La). No grupo das proteínas minoritárias destacam se imunoglobulinas, sêrum albuminas, o sistema lactoperoxidase, proteoses peptonas, lisozima, lactoferrina, e eventualmente, macropeptídeos de caseína (HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2011). O quadro 3 resume as principais características físicas e químicas das proteínas do soro do leite.

Quadro 3 Características químicas e físicas das proteínas do soro do leite

Proteína	Ponto Isoelétrico (PI)	Peso Molecular (kDa)	Quantidade de aminoácidos	Quantidade ^a (%)
β -lactoglobulina	5,3 – 5,5	18, 3 Da	162	40-50
α -lactoalbumina	4,8	14	123	10-20
Imunoglobulinas	5,5 – 8,3	150-900	-	8
Albumina sérica	4,7 – 4,8	66	580	10-15
Lactoperoxidase	9,5	78	610	1
Proteoses/ peptonas	-	20	-	0,2
Lactoferrina	8	76 ^b	691	1
Macropeptídeos de caseína	4,3-4,6	6,8	64	10

a Valor em relação ao conteúdo total de proteína do soro do leite b peso referente apenas a fração proteica

As proteínas do soro de leite caprino apresentam quase todos os aminoácidos essenciais além da quantidade recomendada, como exceção dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que estão em quantidade dentro da recomendada. Ademais, as

proteínas do soro apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina. (SGARBIERI, 2005)

Hejtmánková et al. (2012) em estudo sobre as diferenças entre a composição do leite e do soro de cabras e ovelhas em diferentes estágios de lactação encontrou que os aminoácidos presentes em maior concentração no soro são respectivamente glutamina, alanina e leucina. E que em relação aos aminoácidos presentes no leite, poucas diferenças podem ser encontradas. Há maiores quantidades de metionina no leite, enquanto que o soro apresentou maiores teores de alanina e glicina. Não houve variação no quantitativo dos aminoácidos lisina, isoleucina leucina valina e arginina entre o soro do leite e o leite. O autor sugere que esses valores estão relacionados com o alto valor biológico das proteínas do soro, e que há uma significativa quantidade remanescente de aminoácidos do soro para o leite.

As proteínas do soro podem ser encontradas de 3 formas distintas, sendo estas: a proteína concentrada, quando ainda há a presença de outros componentes do soro como lactose e gordura, contudo a maior parte da água foi retirada por algum tipo de processamento tecnológico; proteína isolada, quando a maior parte dos outros componentes foi retirada do produto; e hidrolisada quando a proteína é submetida ao processo de hidrólise (SOUSA et al., 2012; KANDA et al., 2013).

2.3.1 β -lactoglobulina

É a proteína presente em maior quantidade na composição do soro do leite, condizendo a uma concentração aproximada de 2,8 g/L. Estruturalmente, é uma proteína globular de massa molecular em torno de 18.362 kDa, apresenta 162 aminoácidos em sua constituição. Sua conformação molecular apresenta 9 segmentos em folhas β antiparalelas que se arranjam formando uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior. Geralmente se apresenta na forma de dímero com 2 subunidades idênticas onde cada monômero consiste em um grupo sulfidríla e duas pontes dissulfeto. (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; WALSTRA et al., 2010)

Esse arranjo estrutural observado na β -Lactoglobulina caracteriza uma família de proteínas denominadas lipocalinas, essa estrutura específica confere propriedades funcionais de grande aplicação na indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor. (YADAV et al., 2015)

A estrutura da β -LG contribui para esta ser uma proteína estável em solução, em uma ampla faixa de pH, apresentando, diferentes estados de associação. Na faixa de pH entre 9 e 12 ocorre o processo de desnaturação alcalina irreversível, que resulta na ruptura da estrutura dimérica nativa, transformando-se em monômeros desdobrados. O seu ponto isoelétrico ocorre em pH ácido na faixa de 5,3 a 5,5 onde apresenta o seu menor grau de solubilidade. (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; WALSTRA et al., 2010)

Já com relação a sua resistência térmica, a lactoglobulina é uma proteína termossensível, onde a temperatura é capaz de causar efeitos diversos na sua funcionalidade tais como a perda de solubilidade e a exposição de regiões da molécula para diferentes tipos de interação com outros componentes. A desnaturação da proteína ocorre na faixa de temperatura de 70-75 °C nessa temperatura o grupo sulfidril SH é exposto e assim reage com a caseína provocando menor estabilidade do leite ao calor e a coagulação através da renina é prejudicada, pois o coágulo formado é irregular (WALSTRA et al., 2010).

2.3.2 α -lactoalbumina

A α -Lactoalbumina (α -LA) é a segunda maior constituinte da composição proteica do soro do leite, com uma concentração de 1,2 gramas de proteína por litro de soro correspondendo a 11% do total de proteínas. É uma proteína sintetizada na glândula mamária, que possui caráter hidrofóbico é capaz de se ligar a íons metálicos como o cálcio e o zinco, sendo assim classificada como uma metaloproteína. A forte ligação exercida com o cálcio aumenta a estabilidade da conformação molecular dessa proteína.

Com relação a sua estrutura, é uma pequena proteína globular constituída por 123 resíduos de aminoácidos em uma estrutura esférica, altamente compactada, com uma única cadeia polipeptídica que possui 4 ligações dissulfeto. Sua massa molecular é próxima a 14,0 kDa e o ponto isoelétrico é no pH em torno de 4,8. (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; MARKUS et al., 2002)

Devido as suas características morfológicas, é a proteína mais estável do soro do leite onde o processo de desnaturação ocorre em pH 6,7 e 65 °C, com 80 a 90% de reversibilidade sob resfriamento. Outra característica da α -LA é a forte tendência de formar associações em pH abaixo de seu pI, no pH natural do leite, pH 6,6 e acima, a α -LA apresenta-se como monômero com sua estrutura terciária. A similaridade estrutural da α -LA com a lisozima, proteína presente no ovo, permite a possibilidade de substituição dessa proteína quando necessário (MODLER, 2009).

2.3.3 Imunoglobulinas

A concentração de imunoglobulinas no leite e conseqüentemente no soro esta relacionada à fase de lactação do animal, onde no colostro as imunoglobulinas aparecem em maior concentração do que em outras fases, pois nessa etapa são responsáveis por transmitir imunidade passiva aos mamíferos recém-nascidos. No soro do leite maduro, a concentração de imunoglobulinas é por volta de 0,7 mg/L e no colostro essa concentração pode chegar a um pico de 50 mg/L (SGARBIERI, 2005).

As imunoglobulinas (Ig) presentes no soro do leite são principalmente de 3 classes, IgG (G1 e G2) IgA e IgM, constituem uma família de proteínas de elevado peso molecular e que apresentam diversas propriedades físicas, químicas e imunológicas. Uma característica estrutural comum a todas as classes é que são monômeros (IgG) ou polímeros (IgA e IgM) formados de unidades de quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias curtas (~20 kDa) e duas cadeias longas (50-70 kDa), ligadas por pontes dissulfeto. A IgG se apresenta em maior concentração dentre as 3 classes, correspondendo a 80% do total das imunoglobulinas. (MOLLEA et al., 2013)

As IgG existem essencialmente como monômeros, contendo na molécula 2-4% de carboidrato e peso molecular de 160 kDa. A IgG1 se apresenta em maior concentração no soro representando cerca de metade do quantitativo total de proteínas, a IgG2 está presente tanto no colostro como no leite, contudo em concentração mais baixa quando comparada a IgG1. A IgA apresenta-se como dímero com peso molecular de aproximadamente 400 kDa, contendo 8-9% de carboidrato, aparece no soro na sua forma livre. Já a IgM é uma macroglobulina que ocorre no soro em concentrações relativamente baixas, aparece na forma de pentâmero, com peso molecular em torno de 900 kDa, contem cerca de 12% de carboidrato. O ponto isoelétrico das imunoglobulinas é apresentado em uma faixa bem ampla de pH variando de 5,5 a 8,3. (YADAV et al., 2015)

2.3.4 Albumina Sérica

A albumina sérica é uma proteína que apresenta composição e propriedades físicas semelhantes a da albumina sanguínea. Sua concentração no soro do leite é cerca de 15% do conteúdo proteico total do soro, e altas quantidades dessa proteína tanto no leite quanto no soro estão correlacionadas com animais com mastite.

Possui estrutura conformacional globular, hidrossolúvel, formada por uma cadeia polipeptídica com cerca de 580 resíduos de aminoácidos, apresenta um grupo sulfidrílo livre do peptídio N-terminal e a 17 pontes dissulfeto na sua molécula (MICHAELIDEOU, 2006).

Sua estrutura secundária é formada de 54% α -hélice, 40% de estruturas β (folhas e giros β) com 3 domínios específicos para ligação de íons metálicos, de lipídios e de nucleotídios, respectivamente. Apresenta peso molecular 66,2 kDa e pI a pH 4,7-4,8. Em pH abaixo do ponto isoelétrico apresenta alterações em suas propriedades físicas e químicas, como aumento da viscosidade intrínseca, volume molecular e redução acentuada de solubilidade.

O rompimento das pontes dissulfeto da molécula promove alterações físicas e estruturais afetando principalmente no perfil de solubilidade da proteína em função do pH. Quando estas ligações são rompidas a região de solubilidade mínima encontra-se na faixa de 3,5 – 5, contudo a tendência é que essa faixa aumente proporcionalmente com o número de ligações rompidas (HARAGUCHI, ABREU, DE PAULA, 2006)

2.3.5 Lactoperoxidase

O sistema lactoperoxidase é um sistema enzimático natural de defesa do hospedeiro presente nos mamíferos, que permanece remanescente no leite e no soro representando cerca de 1% da proteína do soro do leite. É composto por três elementos básicos: a enzima lactoperoxidase (LP), uma proteína sintetizada na glândula mamária; o íon tiocianato (SCN^-), originado pelo metabolismo hepático; e as moléculas de oxigênio reativas, derivadas da atividade de leucócitos e de outras células (MOLLEA et al., 2013).

Possui uma única cadeia polipeptídica de cerca de 610 resíduos de aminoácidos. Apresenta 12 grupos cisteínas e um grupamento heme em sua molécula. Seu ponto isoelétrico é em torno do pH 9,5. (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). A massa molecular desse Sistema é de aproximadamente 78 kDa. A atividade enzimática é influenciada pelo binômio temperatura/ tempo, onde os parâmetros 62,5 °C/ 30 min, 70 °C/ 15 min ou 85 °C/ 15 (s) são suficientes para a inativação (MOLLEA et al., 2013).

2.3.6 Proteoses e peptonas

É uma fração proteica do leite presente no soro após o processo de pasteurização seguido de acidificação do leite para obtenção do soro, sob condições de pH 4,7. Este complexo proteico possui 4 componentes. O componente-3 parece derivar da membrana do

glóbulo de gordura do leite enquanto os outros três componentes peptídicos são originários da β -caseína a partir da ação da plasmina nativa (KRISSANSEN, 2007).

A massa molecular dessa fração é de 20 kDa e a concentração no soro do leite é de 0,2 % do conteúdo proteico total, por esta razão poucos resultados encontram-se descritos na literatura bem como as aplicações alimentares desse complexo proteico e suas atividades biológicas (SGARBIERI, 2005)

2.3.7 Lactoferrina

É uma glicoproteína de transporte, que estabelece ligações fortes. Apresenta características básicas com ponto isoelétrico em torno de pH 8. Com o ferro ligado, apresenta resistência ao calor e à ação química ou enzimática, a remoção da porção glicídica resulta em incapacidade de ligação com o ferro. A lactoferrina é capaz de polimerizar rapidamente na presença de íons de Ca^{++} (KRISSANSEN, 2007).

Por apresentar uma porção glicídica considerável seu comportamento eletroforético é heterogêneo devido a sua tendência a formar produtos de interação. A completa sequência de aminoácidos da lactoferrina apresenta duas subunidades homólogas e 691 resíduos de aminoácidos, cada uma com único sítio de ligação ao Fe^{+3} e único sítio de glicosilação podendo assim ter uma ou duas cadeias de carboidrato ligadas a sua molécula. A massa molecular da proteína glicosilada é de cerca de 400 kDa, e apenas a fração proteica corresponde a 76 kDa (MICHAELIDEOU, 2006).

É notável a similaridade da lactoferrina presente no soro do leite com a lactoferrina encontrada na corrente sanguínea, que é responsável pelo transporte do ferro no sangue. Dessa maneira acredita-se que seu papel no leite também envolva a ligação de ferro, fazendo-o de modo tão eficiente que torna o ferro inacessível para o crescimento de bactérias (incluindo algumas patogênicas) (MICHAELIDEOU, 2006).

2.3.8 Macropeptídeos de Caseína

Também denominado como glicomacropeptídeo (GMP) é um componente originado a partir da k-caseína durante o processamento enzimático da fabricação de queijos. Possui 64 resíduos de aminoácidos em sua molécula e massa molecular de 6,8 kDa. Os aminoácidos presentes são na maioria de cadeia ramificada, é termoestável e está inserido na fração de proteases peptonas. Seu ponto isoelétrico se encontra na faixa de pH de 4,3 a 4,6 o grau de

glicosilação da molécula varia de 0 a 5 unidades de ácido siálico, contudo 25 a 50% dos glicomacropéptídeos podem não ser glicosilados.

As moléculas GMP têm características únicas devido à ausência de resíduos de fenilalanina, triptofano, tirosina, histidina, arginina ou cisteína. A ausência de fenilalanina torna esta proteína um ingrediente de dieta valioso para pacientes que sofrem de fenilcetonúria (RAJPUT et al., 2013; MODLER, 2009; KRISSANSEN, 2007; MARSHALL, 2004).

Portanto, considerando o valor biológico do soro do leite acima discutido, podemos reafirmar ainda mais a importância do seu reaproveitamento, bem como dos estudos que possam bioprospectar o potencial destas proteínas.

2.4 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DAS PROTEÍNAS DO SORO

A aplicação tecnológica das proteínas do soro do leite é baseada nas características físico-químicas (solubilidade, gelificação, viscosidade, emulsificação, formação de espuma) que aliadas ao potencial funcional das proteínas do soro potencializa o interesse comercial da utilização destas como ingrediente alimentício (ALVES, M. P. et al., 2014).

Alguns fatores podem influenciar a composição e as características tecnológicas e funcionais dos produtos obtidos a partir da proteína do soro, a exemplo do método de obtenção do soro, o tipo de leite do qual o soro é proveniente e os processamentos aos quais estas serão submetidas antes de serem utilizadas (REZAEI et al., 2011).

Tanto no estado nativo quanto após tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos as proteínas do soro podem ser utilizadas, pois podem adquirir após estas transformações diferentes estruturas conformacionais. Uma vez que são moléculas estruturalmente ordenadas e qualquer alteração na conformação leva à desnaturação (pela ação da temperatura, radiação ultravioleta, concentração salina, alterações de pH ou ação mecânica) ocorre assim modificação da conformação globular das proteínas para a forma linear, com a perda da estrutura terciária da cadeia peptídica, com formação de novas organizações entre as moléculas, que tornam as proteínas quimicamente mais reativas (WALSTRA et al., 2006).

Tecnologias de secagem são frequentemente utilizadas nas proteínas do soro, devido a grande atividade de água que vem a prejudicar a sua estabilidade. Após a retirada da água, o produto concentrado é classificado de acordo com o teor de proteína, devido a suas

características nutricionais e tecnológicas, e pode ter aplicações diversas que vão do seu uso como ingrediente alimentício à produção de medicamentos (ALVES, M. P. et al., 2014).

Alguns produtos derivados das proteínas do soro podem ser encontrados comercialmente dentre os principais: o concentrado proteico de soro (*whey protein concentrate* – WPC) produto obtido pela remoção de constituintes não proteicos do soro de forma que o produto final seco contenha, em geral, entre 35% e 80% de teor proteico. O isolado proteico de soro (*whey protein isolate* – WPI) que é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém entre 80 e 95% de proteína (BRANS, 2006). E a proteína do soro hidrolisada (*whey protein hydrolysate* – WPH, que é obtido pela hidrólise das moléculas de proteínas durante seu processamento com a formação de segmentos proteicos menores; concentrados de soro com teor de lactose reduzido, que são produtos especiais com teor de lactose inferior a 1% e também o soro com teor de minerais reduzidos (produto obtido pela remoção seletiva de uma parte dos minerais do soro através dos processos de troca iônica, eletrodialise ou outras técnicas de separação por membranas) (CORREIA et al., 2011).

2.5 HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

Diversas podem ser as finalidades atribuídas a hidrolise das proteínas do soro podendo apresentar tanto um enfoque tecnológico devido a alteração de características como a solubilidade e viscosidade. Como há importância do ponto de vista nutricional, uma vez que são diversos os trabalhos na literatura que atribuem biofuncionalidade à proteína hidrolisada do soro do leite (DULLIUS, GOETTERT, SOUZA, 2018).

A hidrolise das proteínas pode ser mediada pela ação de proteases, que são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases e catalisam a hidrolise das ligações peptídicas e ainda podem agir sobre ligações éster e amida. Esta classe de enzimas está envolvida em diversos processos biológicos, como a digestão, o transporte de membranas e a coagulação do sangue. Todas as proteases possuem certo nível de especificidade quanto ao substrato, ou seja, são particulares quanto aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada, embora a posição de ligação na cadeia polipeptídica e o tamanho da mesma possam vir a influenciar na atividade enzimática (KOBLOITZ, 2008).

Diferentes tipos de enzimas proteolíticas podem ser empregadas, tais como as proteases de origem microbiana como a subtilisina (conhecida comercialmente como alcalase, produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis*), de origem vegetal, como a bromelina e a

papaína. Podem ser empregadas também enzimas de origem animal, por exemplo, as que participam da digestão no trato gastro intestinal: tripsina, pepsina e a amilase salivar, (ZHANG, WU, LING LU, 2013). Nessa revisão serão mais bem discutidas as características bioquímicas e propriedades de atuação das principais enzimas utilizadas na tecnologia de alimentos e na hidrólise das proteínas do soro do leite de acordo com o que foi descrito por KOBLITZ (2008).

Dentre as enzimas de origem vegetal a papaína é extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*) é caracterizada como uma cisteína-protease, pois apresenta em seu sítio ativo cisteína conjugada com histidina. É comercializada geralmente na forma de extrato bruto contendo diferentes proteases, como a papaína e quimiopapaína sendo bastante utilizada para fins terapêuticos devido a sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante (BATISTUZZO, 2006). Quanto a sua atividade enzimática, sua faixa de atuação é ampla, entre o pH 5,0-9,0 contudo é observado que ótima eficiência proteolítica em pH 7,0 e temperaturas entre 60-70 °C. Apresenta baixa especificidade por substrato, mas age preferencialmente em ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, Valina e Leucina (KOBLITZ, 2008).

A bromelina, enzima obtida a partir do abacaxi ou do pedúnculo do abacaxizeiro, é menos termorresistente e menos específica que a papaína. O melhor grau de atividade enzimática é observado na faixa de pH de 6,0-8,0, em temperatura de 40 °C (valores de temperatura acima de 70 °C são desnaturantes).

A pepsina é uma protease aspártica, produzida pela mucosa estomacal na sua forma inativa, o pepsinogênio, contém ácido aspártico no seu sítio ativo, e tem baixa especificidade, porém apresenta maior afinidade por aminoácidos polares e aromáticos. A faixa de pH para sua ação é de 1,0 a 4,0, embora o pH ideal seja 1,8 e o pH 6 seja responsável por inativá-la completamente.

Outra enzima que é bastante utilizada devido ao seu importante papel na digestão é a tripsina uma serina protease (contém Ser no seu sítio ativo) secretada pelo pâncreas na sua forma inativa, pepsinogênio e ativada no duodeno. Uma característica importante dessa enzima é a alta especificidade, uma vez que só hidrolisam ligações que envolvam o grupo carboxílico da Lisina e Arginina. Os parâmetros ótimos para sua atividade encontram-se na faixa de pH entre 7,0 e 9,0, (em pH muito ácido sofre autólise) e temperatura de 36° C.

Silvestre et al. (2012) investigaram os melhores parâmetros de obtenção do perfil peptídico e da atividade de inibição da ECA de proteínas hidrolisadas do soro do leite concentrado utilizando papaína e pancreatina. Os resultados deste trabalho mostram que as

condições de hidrólise são parâmetros fundamentais na obtenção de um perfil peptídico adequado, e que a hidrólise utilizando papaína gerou o melhor perfil de peptídeos, mas ambas as enzimas demonstraram serem capazes de gerar peptídeos com atividade inibidora da ECA.

Em outro estudo Demers-Mathieu et al. (2013) investigaram a atividade antibacteriana de peptídeos gerados por hidrólise do soro do leite isolado a partir da utilização de tripsina e quimiotripsina. Os resultados mostram que os peptídeos derivados de β -Lg foram capazes de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* mas não demonstraram atividades frente a diferentes cepas de *Escherichia coli*.

Lacroix e Li-Chan (2013) realizaram a hidrólise do soro do leite isolado, e das proteínas α -La, β -Lg, albumina sérica, e lactoferrina utilizando pepsina para verificar a potencial capacidade dos peptídeos gerados de inibirem a ação da enzima dipeptidil peptidase (DPP-IV) e α -glicosidase. Todos os hidrolisados demonstraram ser capaz de inibir a DPP-IV, sendo o hidrolisado de α -La o que demonstrou melhor potencial. Com relação à inibição da α -glicosidase apenas os hidrolisados do soro do leite isolado, de β -Lg, e de α -La demonstraram atividade. Sugerindo assim que os peptídeos gerados podem regular a glicemia.

Na reação de hidrólise pode ser utilizada apenas uma enzima para toda a reação ou podem ser feitas combinações entre duas ou mais enzimas, a depender da necessidade de quem conduz o processamento. Em seu trabalho Shin et al. (2007) utilizaram papaína e tripsina para hidrolisar a proteína do soro do leite bovino e assim obtiveram menores quantidades de β -Lg e peptídeos com propriedades antigênicas reduzidas.

Alguns fatores devem ser levados em consideração durante a reação de hidrólise, uma vez que se trata de uma reação enzimática onde algumas características podem vir a interferir na velocidade e na efetividade da reação, tais com: a adequação do pH do substrato com a faixa de atividade do pH da enzima, a temperatura aplicada durante a reação, a relação entre a concentração de enzima e de substrato (KOBELITZ, 2008).

Naik et al., (2013) investigaram o efeito da razão enzima substrato, pH e temperatura no grau de hidrólise de soro do leite concentrado utilizando tripsina, e observaram que a razão enzima/substrato e o pH foram os fatores de maior influência no grau de hidrólise.

A potencial formação de peptídeos bioativos pela hidrólise do soro do leite de cabra tem sido fundamentada e investigada ao longo dos anos. Brandelli, Daroit e Corrêa (2015) dividiram os efeitos fisiológicos da proteína hidrolisada do soro em quatro diferentes grupos, sendo estes: I. Efeitos no sistema imunológico: atividade antimicrobiana, imunomodulatória e citomodulatória; II. Efeitos no sistema cardiovascular: Atividade anti-hipertensiva, antioxidante, antitrombótica e hipocolesterolêmica; III. Efeitos no sistema nervoso:

Atividades agonistas e antagonistas opióides; e IV. Efeitos no sistema gastrointestinal: atividade antiulcerativa, inibição do apetite e reações com minerais.

Tulipano et al. (2012) em seu trabalho verificou que a hidrólise *in silico* da β -Lg oriunda do soro do leite de caprinos e ovinos pela tripsina é capaz de inibir a enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-4) sugerindo assim que estes peptídeos podem ser utilizados no controle do *Diabetes Mellitus* tipo 2

Almaas et al. em múltiplos estudos (2011), (2008) e (2006) desenvolveram estudos *in vitro* e metodologias de hidrólise do soro do leite caprino utilizando suco gástrico, suco duodenal e enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina e quimiotripsina para obter diferentes perfis peptídicos e avaliar a capacidade destes hidrolisados proteicos de inibirem o crescimento de micro-organismos, dentre estes foi demonstrado capacidade inibir o crescimento de cepas de *Escherichia coli* HMG INF01, *Escherichia coli* K12, *Bacillus cereus* RT INF01 e *Listeria monocytogenes*.

Recio et al. (2009) e Hamme, et al. (2009) observaram em seus estudos a capacidade dos peptídeos obtidos pela hidrólise do soro (ácido) do leite de cabra utilizando enzimas isoladas de micro-organismos de queijos de leite cru em inibir a enzima conversora de angiotensina- ECA. Foi observado que a maior hidrólise foi da proteína α -La, mas não foram identificados peptídeos específicos. Coates (2003) explica que a capacidade de inibir a ECA está relacionada com a diminuição da pressão arterial, uma vez que essa enzima exerce um papel fundamental no sistema renina-angiotensina, responsável por regular a pressão arterial e a homeostase de eletrólitos no organismo. A inibição da ECA diminui a pressão arterial por impedir a catálise da angiotensina I em angiotensina II (vasoconstrictor), e a degradação da bradicinina que tem ação vasodilatadora, diminuindo assim a vasoconstricção periférica.

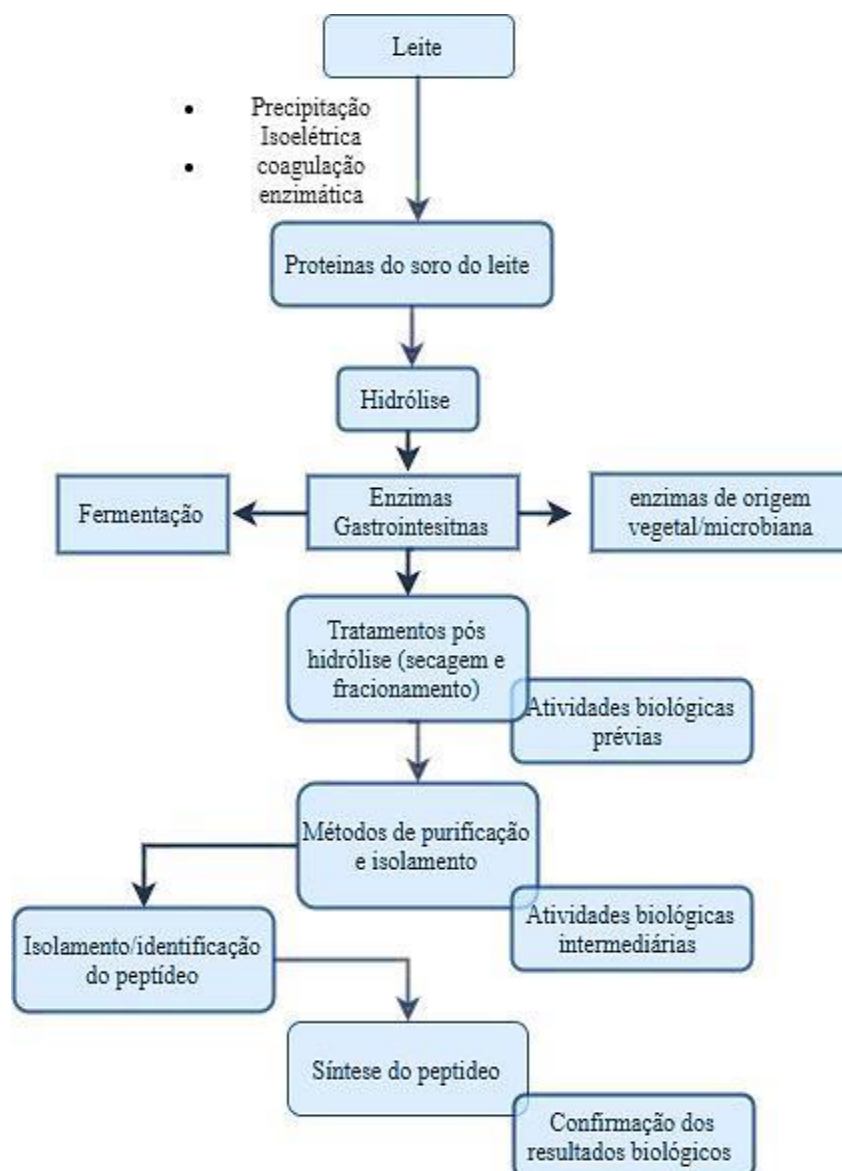
2.6 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO SORO

Os peptídeos quando estão na sequência original da proteína não são capazes de exercer bioatividade necessitando assim serem liberados a partir de reações hidrolíticas. Estas reações podem ser desencadeadas por diversos mecanismos, tais como: enzimas digestivas, ou pela atividade proteolítica de micro-organismos, síntese química e/ou através da ação de vegetais ou proteases microbianas (KORHONEN, PIHLANTO, 2006).

Haque e Chand (2008) definem estas moléculas como “fragmentos proteicos específicos, que contém cerca de 3 a 20 resíduos de aminoácidos, que tem um impacto

positivo no funcionamento corporal e podem proporcionar influências na saúde.” Outra definição, traz que os peptídeos apresentam atividade similar a uma droga ou hormônio, que eventualmente modulam a função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo, levando a indução de respostas fisiológicas. A figura 1 traz um resumo das principais etapas envolvidas na obtenção de peptídeos bioativos.

Figura 1 Etapas envolvidas no processo de pesquisa de peptídeos bioativos do soro do leite



Fonte: BUTYLINA et al., 2006; BRANDELLI, DAROIT, CORRÊA, 2015; YADAV et al., 2015.

Além do processo de obtenção usual por hidrólise, é possível identificar, em alguns casos, peptídeos que são naturais ao leite ou ao soro do leite, ou ainda estarem presentes em

produtos lácteos fermentados, tais como iogurte, leite coalhado e queijo (MORRIS FITZGERALD, 2008).

Os peptídeos bioativos que são produzidos durante o processo de hidrólise são posteriormente purificados através de técnicas analíticas. Uma técnica que é frequentemente utilizada para a purificação de peptídeos é a cromatografia de fase reversa em cromatógrafo líquido de alta eficiência - HPLC, utilizando coluna C18, onde a identificação dos picos pelo cromatograma permite a coleta dos peptídeos possibilitando assim a sua purificação (YADAV et al., 2015).

Uma vez purificados os peptídeos são geralmente caracterizados por análise de espectrometria de massas em equipamento quadrupolo híbrido com separador de mobilidade de íon e aceleração ortogonal por tempo de voo. Após a ionização, analisadores de massas detectarão as relações massa/carga (m/z), produzindo espectros que serão então confrontados com diferentes bancos de dados, possibilitando a identificação das proteínas e dos peptídeos (YADAV et al., 2015; BUTYLINA et al., 2006). Dessa forma, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando a proteína hidrolisada do soro devido à presença de peptídeos bioativos que podem apresentar efeitos biológicos benéficos para o organismo, podendo assim caracterizar o soro do leite como uma matriz alimentar com potencial funcional. (BRANDELLI, DAROIT, CORRÊA, 2015).

Dentre os efeitos funcionais dos peptídeos bioativos de hidrolisados da proteína do soro que tem sido descritos pela literatura estão efeitos antioxidantes, antiproliferativos e antibacterianos, imunomoduladores, anti-diabéticos, anti-colesterolêmicos, efeitos benéficos na microbiota intestinal, efeitos no sistema nervoso como inibidores e estimulantes opióides. (MACEDO 2010; MADUREIRA et al., 2010; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008; YALCIN, 2006).

2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A peroxidação lipídica que ocorre nos alimentos liberando radicais livres é um problema pertinente e implica em menor tempo de vida de prateleira do produto. A ocorrência desta reação é responsável pelo surgimento de características sensoriais desagradáveis e redução do valor nutricional do alimento, colocando em risco a segurança alimentar do consumidor, devido à liberação de substâncias tóxicas que podem vir a causar danos a nível celular no organismo (PENG, KONG, XIA, LIU, 2010).

Cada vez mais a indústria de alimentos busca utilizar aditivos naturais aos alimentos, tanto devido a potencial toxicidade dos aditivos sintéticos como em consequência da tendência atual do consumidor de optar por opções mais saudáveis e naturais nos produtos. (ZHANG et al., 2009)

A capacidade antioxidante dos peptídeos do soro de leite está relacionada a mecanismos de inativação das espécies reativas do oxigênio, retirada dos radicais livres, inibição da peroxidação lipídica, quelação com íons metálicos, ou uma combinação destes mecanismos. Os peptídeos antioxidantes geralmente tem maior número de grupos ionizáveis e também maior exposição de grupos hidrofóbicos em sua molécula, usualmente consistem em cadeias com resíduos de 5-11 aminoácidos (ZHOU et al., 2012; SARMADI, ISMAIL, 2010).

O modo de ação vai ser influenciado de acordo com a composição de aminoácidos e a sequência dos peptídeos. Portanto, levando em consideração a variabilidade de peptídeos e de aminoácidos presentes nos hidrolisados, torna-se imprescindível avaliar a capacidade antioxidante por diferentes métodos (PHELAN et al., 2009).

Entre as metodologias mais utilizadas, estão as baseadas na capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) utilizando o radical ABTS e DPPH, método que detecta transferências de elétrons e transferência de átomos de hidrogênio, avaliação da quelação com íons metálicos por meio do teste de poder antioxidante de redução de íons férricos (FRAP).

A atividade antioxidante das proteínas e dos hidrolisados das proteínas do soro tem sido amplamente estudadas. Power et al. (2014) em seu trabalho com um hidrolisado trípico (enzimas tripsina e quimiotripsina) após fracionamento por ultrafiltração da β -Lg observou alta capacidade antioxidante dos peptídeos obtidos após a hidrólise (5.63 μ mol TE/ μ mol peptídeo).

Após a hidrólise de soro do leite de ovelha, Corrêa et al. (2014) com uma protease de origem microbiana obtida a partir de *Bacillus spp* durante 6 h, obtiveram hidrolisados de proteína do soro com atividade antioxidante e de inibição da enzima conversora de angiotensina. Os autores observaram que o teor de proteína solúvel e amino ácidos livres aumentaram após 4 h de processamento. E a máxima atividade antioxidante foi obtida após 6 h, enquanto que a máxima inibição da ECA ocorreu após 4 h de hidrólise.

É frequente a ocorrência de peptídeos bioativos com propriedades multifuncionais, por exemplo, a maioria dos peptídeos que são capazes de desempenhar atividade antioxidante também podem inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008).

Os peptídeos capazes de inibir a ECA tem um potencial anti-hipertensivo na fisiologia do organismo. A ECA é uma enzima que está localizada em diversos tecidos e desempenha um papel fisiológico chave no sistema renina-angiotensina, calicreína-cinina e no sistema imune (CONTRERAS, et al., 2011).

A atuação da ECA nesse sistema é de forma bastante direta, pois esta é responsável por aumentar a pressão do sangue a partir da catálise da reação de conversão de angiotensina 1 para angiotensina 2 (um potente vasoconstrictor) e também por degradar a bradicinina (peptídeo vasodilatador). Dessa forma o quadro de hipertensão arterial é observado quando a ECA catalisa a hidrólise da angiotensina I em angiotensina II, em maior medida do que o necessário (COSTA et al., 2005).

Peptídeos capazes de inibir a ECA geralmente contêm resíduos de 2 a 27 aminoácidos, e estão relacionados a hidrólise das proteínas majoritárias do soro do leite usando as enzimas pepsina, tripsina, quimiotripsina e subtilisina (Alcalase ®) com níveis de inibição na faixa de 70-90% a depender da enzima utilizada (TAVARES, CONTRERAS et al., 2011; TAVARES, MONTEIRO et al., 2011).

2.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As proteínas do soro como a lactoferrina, lisozima e os fragmentos de ambas são os mais estudados em relação à atividade antimicrobiana. As proteínas majoritárias parecem ser menos exploradas pela literatura, embora os peptídeos derivados das proteínas do soro do leite têm suas potencialidades e pode ser observada uma maior tendência em trabalhos que envolvam sua utilização em comparação com a proteína nativa (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2014; CHATTERTON et al., 2006).

O mecanismo pelo qual ocorre o efeito antibacteriano tem sido atribuído a dois modos de ação principais dependendo da fração proteica a qual se refere. A habilidade de quelar íons, principalmente o ferro, privando o crescimento de bactérias que necessitam desse íon está mais intimamente relacionada às proteínas minoritárias do soro (BRANDELLI, DAROIT e CORRÊA, 2015).

Com relação às proteínas majoritárias do soro, o passo inicial da morte bacteriana envolve a fixação / adsorção do peptídeo na membrana bacteriana, que poderá implicar a participação de forças eletrostáticas. Seguida dessa interação, o caráter anfipático pode também ser uma parte importante com vista à inserção da região hidrofóbica do peptídeo na

membrana do núcleo apolar. Diversos podem ser os mecanismos que conduzem à formação de poros da membrana transitória, afetando assim processos de geração de permeabilidade e/ou energia ou podem resultar na ruptura da membrana plasmática e morte celular. (BENKERROUM, 2010; AKALIN, 2014).

Outro aspecto que deve ser considerado é que a maioria dos peptídeos antimicrobianos identificados até agora a partir das proteínas do soro do leite possuem cargas negativa ou neutras. Estes peptídeos usualmente exibem menor atividade contra bactérias Gram-negativas, o que pode ser resultante da repulsão de cargas entre os peptídeos e as cargas negativas dos lipopolissacarídeos na membrana externa destas bactérias. (DEMERS-MATHIEU et al., 2013)

Theólier et. al (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana da fração proteica menor que 10 kDa após a hidrólise do soro do leite isolado, por 45-90 minutos utilizando pepsina, tripsina e quimiotripsina. Estes autores conseguiram purificar seis diferentes frações do hidrolisado através de cromatografia de fase reversa, onde todas demonstraram inibir o crescimento de cepas de *Listeria innocua* e *Escherichia coli*.

A produção de peptídeos bioativos com potencial antibacteriano também foi observada por Osman et al. (2016). Neste estudo os pesquisadores utilizaram a enzima Alcalase®, uma enzima de origem microbiana produzida por cepas de *Bacillus licheniformis*, para hidrolisar soro do leite de cabra. Os hidrolisados que obtiveram o maior grau de hidrólise foram separados por cromatografia de exclusão molecular e observou a maior eficiência destes em inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* do que comparado ao soro do leite de cabra não hidrolisado.

2.9 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTITUMORAL

Devido ao aumento expressivo na incidência de casos de câncer no mundo, as pesquisas tem buscado encontrar moléculas que sejam capazes de agir de modo a diminuir a proliferação de células cancerígenas. Uma vez que a dieta pode vir a ser tanto um fator ambiental de risco para o desenvolvimento desta doença, quanto pode ser utilizada como uma ferramenta de profilaxia (FERLAY et al., 2014).

Há um crescente interesse em investigar metabólitos naturais que modulem biomarcadores de células cancerígenas, dessa forma pesquisas que envolvem os componentes naturais da dieta da população, como as proteínas, e mais precisamente os peptídeos derivados

destas, vêm demonstrando o seu potencial nutracêutico quando atua em diferentes estágios do câncer, incluindo iniciação, promoção e progressão (DE MEJIA, DIA, 2010).

Dessa forma a proteína do soro de leite tem demonstrado apresentar uma potencial atividade antitumoral/antiproliferativa que tem sido respaldada com evidências científicas importantes (PATEL, 2015).

Os isolados de proteína de soro de leite tiveram efeito citotóxico nas células do melanoma B16F10 como demonstrado na expressão alta de caspase-3 em meio *in vitro* (CASTRO et al., 2009).

Em outro estudo Attaallah et al. (2012) evidenciou a ocorrência de um menor número de focos tumorais foi observado quando o hidrolisado de proteína de soro do leite foi alimentado em ratos portadores de câncer de cólon, indicando que a proteína do soro é superior a outras proteínas dietéticas para supressão do desenvolvimento do tumor (PARODI, 2007).

A capacidade antiproliferativa das proteínas do soro pode estar relacionada com a quantidade significativamente alta dos aminoácidos cistina e cisteína e de dipeptídeos γ -glutamilcisteína, que são substratos eficientes para a síntese de glutathione. Embora ainda sejam necessários mais estudos que melhor esclareçam o mecanismo de ação (BRANDELI, DAROIT, CORRÊA, 2015).

Em estudo recente, Medeiros et. al, (2018) verificou a capacidade do soro do leite caprino em exercer efeitos citotóxicos frente a células de glioma de rato C6. Estes autores observaram taxa de autólise celular superior a 70% para células cancerígenas a concentrações de 0,05 e 0,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do soro caprino.

Dentre as proteínas do soro do leite, a lactoferrina tem obtido maior atenção das pesquisas, pois os resultados mostram a sua capacidade de inibir tumores intestinais e possivelmente outros tumores. Acredita-se que o potencial de ação se dê pela atividade do peptídeo lactoferricina (LFcin), derivado da lactoferrina, que atua de diversas maneiras: indução de apoptose, modulação de enzimas metabolizadoras de carcinogênicos, bloqueando o ciclo celular, modificando a expressão gênica e prevenindo a angiogênese (DE MEJIA, DIA, 2010; GILFORD, HUNTER, VOGEL, 2005; MADER, et al., 2005).

Estudos *in vitro* apontam que a lactoferricina tem potente atividade sobre linhagens celulares de diversos tipos de câncer, dentre estes de mama, de cólon, fibrossarcoma, leucemia, câncer de boca e células de câncer de ovário. Um resultado importante é que a ação se limita as células cancerígenas sem prejudicar os linfócitos normais, fibroblastos, células endoteliais ou epiteliais (FURLONG, MADER HOSKIN, 2010).

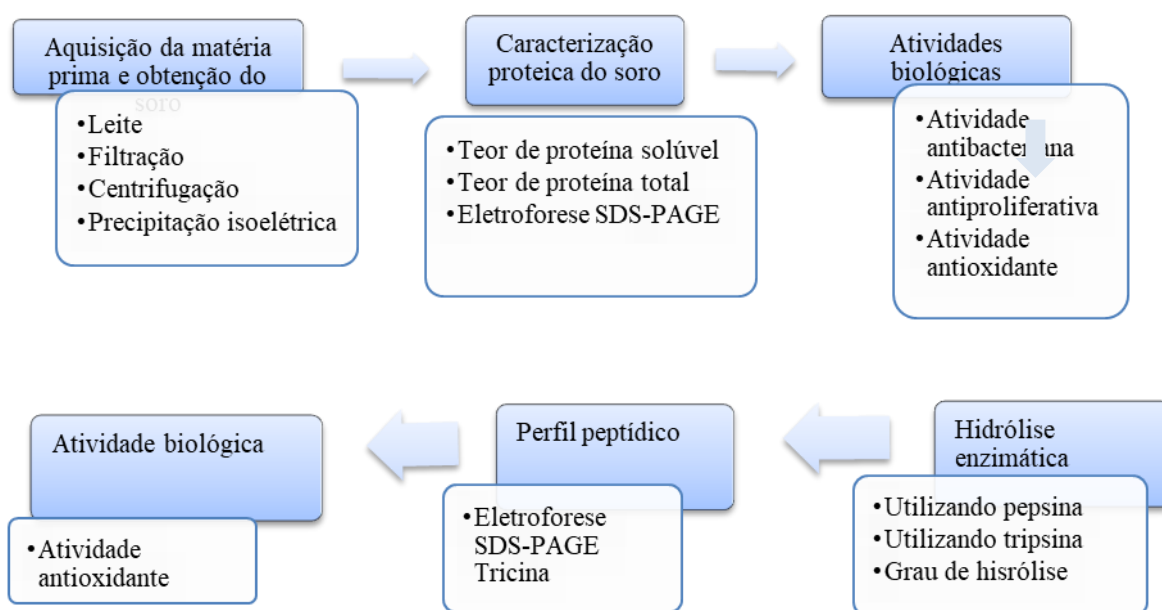
A propriedade seletiva na ação da L^Fcin parece ser devido ao seu caráter fortemente catiônico, possibilitando assim a interação com morfologias carregadas negativamente em células cancerígenas, resultando assim na desestabilização das membranas celulares destas células. O não prejuízo à membrana celular de células saudáveis se dá devido a carga líquida neutra destas, mantendo-as poupadas (DE MEJIA, DIA, 2010).

Embora escassos, existem estudos *in vivo* que demonstram a potencial ação da lactoferrina provocar o estímulo da secreção de citocinas no intestino e dessa forma retardar a carcinogênese do cólon. Um ensaio clínico demonstrou que uma ingestão diária de 3,0 g de lactoferrina bovina suprimiu a proliferação de pólipos colorretais promovendo a expressão de IFN- α (ALEXANDER et al., 2014)

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas desenvolvidas durante esta pesquisa estão esquematizadas na figura 2.

Figura 2 Fluxograma das etapas experimentais



3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia – BioGeR-Lab, do Departamento de Biologia Molecular (DBM), e Laboratório de Proteômica estrutural- Laprote, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus I.

3.2 OBTENÇÃO DO LEITE E PREPARO DO SORO CAPRINO

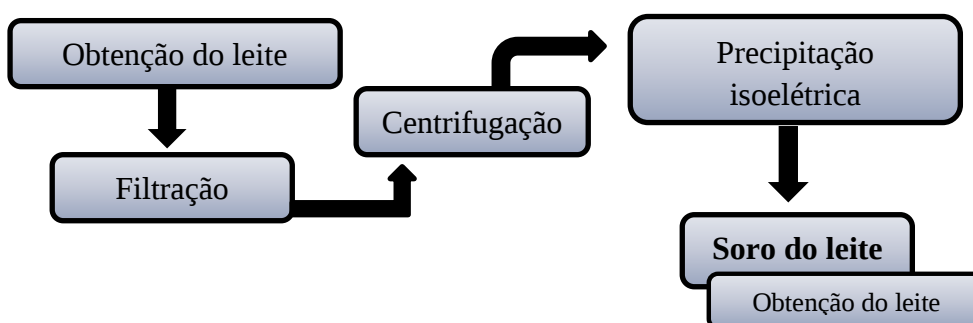
O leite caprino foi obtido do Setor de Caprinocultura, do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus III, no município de Bananeiras / PB.

O leite foi obtido de cabras de um rebanho homogêneo, da espécie Alpina onde os animais, com cerca de 40 ± 6 kg, eram alimentados com ração e estavam com 120 ± 5 dias de lactação. As amostras coletadas foram filtradas e, em seguida, desnatadas por centrifugação antes da obtenção do soro propriamente dito.

O soro do leite foi obtido através de precipitação isoelétrica de acordo com a metodologia descrita por Egito et al., (2006) com modificações, onde ao leite previamente desnatado foi adicionado ácido clorídrico (HCl) $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, até atingir o pH 4,6 (Figura 2)

O sistema foi deixado em repouso e, após verificação da precipitação, foi submetido à centrifugação a frio (20 mins/4 °C/ 5000rpm) para melhor separação do soro da fração caseínica bem como de possíveis fragmentos de gordura. O soro obtido foi dialisado contra água em membrana de 500 Da, congelado a -4 °C, liofilizado (-80 ± 2 °C) e armazenado a 18 ± 2 °C.

Figura 3 Fluxograma de obtenção do soro



3.3 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DO SORO

3.3.1 Determinação do teor proteico solúvel

O teor de proteínas solúveis do soro foi determinado através do método descrito por Bradford (1976), utilizando-se a albumina bovina sérica – BSA, como padrão.

3.3.2 Determinação do teor protéico total

O teor total de proteínas foi determinado de acordo com a Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2000.

3.3.3 Eletroforese SDS-PAGE

Para caracterizar o perfil proteico e estimar o massa molecular das proteínas das amostras, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de

sódio - PAGE-SDS (Sistema Loccus Biotecnologia. Model: Vert-i10), segundo a metodologia de Laemmli (1970).

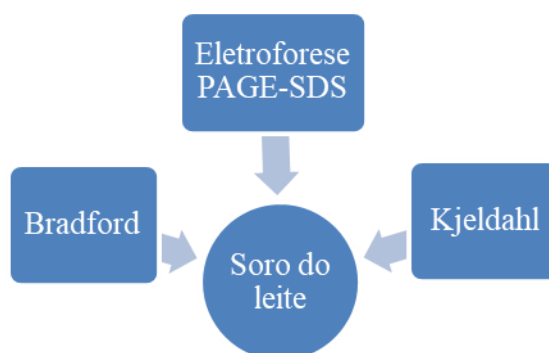
O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, e o gel de separação na concentração de 20% em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,8 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 minutos, e centrifugadas por 2 minutos. Alíquotas de 15 μ L 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 M; TRIS 0,025 M e SDS 10% e o pH ajustado para 8,3.

Ao final da corrida, o gel foi fixado com solução fixadora de metanol, ácido acético e água (40/10/50), durante 45 minutos, em seguida, corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 a 0,005% *overnight*. O excesso de corante foi removido com água destilada morna.

As massas moleculares do marcador proteico utilizado como padrão variaram de 225 a 12 kDa (Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range, GE Health care Life Sciences).

Figura 4 Fluxograma de caracterização proteica do soro



3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *in vitro* DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE CAPRINO

O soro do leite, obtido através da precipitação isoelétrica, foi submetido à hidrólise enzimática *in vitro*, com as enzimas pepsina e tripsina (Sigma-Aldrich), segundo a metodologia utilizada por Ahmed et al. (2015) com modificações.

Foi avaliado o efeito das variáveis pH e tempo sobre o grau de hidrólise (GH) através de um planejamento fatorial 2^2 incluindo três repetições no ponto central, totalizando onze ensaios para cada uma das enzimas (Tabelas 4-5).

Tabela 1 Níveis reais e codificados dos parâmetros do processo para hidrólise do soro leite de cabra, com a utilização de pepsina como enzima proteolítica

Variáveis independentes	Níveis reais e codificados		
	-1	0	+1
pH	1,5	2,0	2,5
Tempo (min)	90	120	150

Tabela 2 Níveis reais e codificados dos parâmetros do processo para hidrólise do soro do leite de cabra, com a utilização de tripsina como enzima proteolítica

Variáveis independentes	Níveis reais e codificados		
	-1	0	+1
pH	6,5	7	7,5
Tempo (min)	90	120	150

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO

3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina

A eletroforese SDS-PAGE Tricina, foi utilizada para verificar a hidrólise de proteínas após a ação enzimática 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%).

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,02%, aquecidas em estufa a 100 °C/ 10 min e centrifugadas por 5 minutos. Alíquotas de 25 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 1h e, 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, 31, 24, 17, 12, 8.5, 3.5 kDA (Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range, GE Health care Life Sciences).

3.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As cepas utilizadas no estudo foram de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, pertencentes à coleção de cepas do BioGer- LAb. A escolha destes micro-organismos foi realizada pela a importância destes como agentes patogênicos e/ou deteriorantes que afetam diretamente a saúde humana.

O soro de leite liofilizado foi testado na concentração de 3 mg/mL ,quantidade que apresenta 1,9 mg de proteína solúvel. O soro foi diluído em água e filtrado em filtros de 0,22µm. Em seguida, foi realizada a diluição seriada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do soro de leite caprino e seus hidrolisados.

Para isso, as bactérias foram crescidas em caldo BHI por aproximadamente 18 horas a 37 °C, e o inóculo foi padronizado para escala de McFarland de 0,5. Foram distribuídos 100 µL de caldo BHI em microplacas de ELISA microtitulação de fundo chato com 96 poços, 100 µL da amostra, realizada a diluição seriada do meio + amostra e em seguida adicionada 20 µL de suspensão bacteriana (10^7 e 10^6 UFC mL⁻¹) em cada poço.

Para cada ensaio foi preparado um controle negativo (C-) e um controle positivo (C+), nas mesmas condições. O material foi incubado a 37 °C durante 24 h, após foi realizada a leitura em um leitor de microplacas e o crescimento bacteriano foi medido com absorbância a 625 nm (OD625). Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

A CIM- Concentração Inibitória Mínima foi calculada de acordo com a menor concentração de amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano. E o percentual de inibição da amostra foi determinado segundo a equação

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

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi avaliada pela metodologia baseada na capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) utilizando os radicais ABTS (método descrito por Rufino et al., 2007) e DPPH (método descrito por Morales e Jiménez-Pérez et al., 2001), onde esses métodos detectam transferências de elétrons e transferência de átomos de hidrogênio.

Para a capacidade antioxidante das amostras pelo método ABTS, as amostras do soro do leite e dos hidrolisados liofilizadas foram diluídas na proporção de 3 mg/mL, 6 mg/mL e 9 mg/mL de água ultra pura. O teste foi realizado em triplicata, com três concentrações para cada amostra. Às amostras foram adicionados 1,5 mL de ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico). Os sistemas foram homogeneizados em vórtex, após 6 minutos, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 515 nm. Os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante de cada amostra e comparando a curva-padrão de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), usado como controle positivo e água ultra pura como controle negativo (Rufino et al., 2007).

Para o método DPPH foram feitas modificações na metodologia. As amostras liofilizadas foram diluídas na proporção de 3 mg/mL, 6 mg/mL e 9 mg/mL de água ultra pura. O teste foi realizado em triplicata com as três concentrações de amostra. Para cada amostra foi adicionado 750µL de DPPH (2,2- Difenil-1- picrilhidrazilo). As amostras foram homogeneizadas em *shaker*, incubados sob agitação por 85 minutos com temperatura entre 20-25°C. Após incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 14500 rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 600nm. Os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante de cada amostra comparando-se a uma curva-padrão de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), usado como controle positivo e água ultra como controle negativo (Morales e Jiménez-Pérez et al., 2001).

3.8 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro*

Para o teste da atividade anticancerígena, as proteínas e os peptídeos foram solubilizados em água ultrapura, esterilizada por filtração em membranas. Foram preparadas cinco diluições, sendo a concentração mínima inicial de 1 µg/mL. Estas diluições foram

conservadas a -20 °C até o momento de sua utilização e a linhagem celular tumoral a ser utilizada foi A375 de células de melanoma malignas humano.

A atividade antitumoral foi avaliada *in vitro* observando a proliferação das linhagens tumorais e não tumoral expostas durante 48 h a diferentes concentrações das proteínas. As células foram cultivadas em microplacas e após o tempo de aderência (24 h) foram expostas a concentrações crescentes do soro do leite caprino por 48 h e comparadas a um grupo controle (tratadas com meio acrescido de solvente). Transcorrido o tempo de incubação, foram realizados ensaios colorimétricos com sal de tetrazolium (MTT) e feita à leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 540 nm.

Foram realizados no mínimo três ensaios independentes para confirmação dos resultados e foi calculada a CI₅₀ (Concentração Inibitória 50), a CIT (concentração Inibitória Total) e a CL₅₀ (Concentração Letal 50).

3.9 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

O grau de hidrólise pode ser definido como a proporção entre o número total de ligações peptídicas que foram clivadas durante a hidrólise (RUTHERFURD, 2010). O grau de hidrólise dos peptideos foi realizado a partir da quantificação do método ortoftaldeído - OPA, utilizando o reagente OPA de acordo com a metodologia descrita por Spellman 2003 com algumas modificações.

O reagente OPA foi preparado utilizando Tetraborato de sódio 10 mM, SDS 20%, betamercaptoetanol e o OPA diluído em metanol. Foi pesado 1 mg de cada amostra e diluída em água ultra pura e mantida a temperatura ambiente.

Foram adicionados 300 µL do reagente , 50 µL de amostra em microplacas de ELISA de fundo chato com 96 poços. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3. 10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios de atividade antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante foram realizados em triplicata e submetidos à análise dos dados utilizando o software *Graphpad Prisma version 6* através da aplicação da Análise de variância - ANOVA utilizando o teste *One way* de múltiplas comparações para obtenção dos resultados. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

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.

AKALIN, A.S. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. **Trends in Food Science & Technology**, n. 36, p. 79–95, 2014.

ALEXANDER, D. D.; SCHMITT, D. F.; TRAN, N. L.; BARRAJ, L. M.; CUSHING, C. A. Partially hydrolyzed 100% whey protein infant formula and atopic dermatitis risk reduction: A systematic review of the literature. **Nutrition Reviews**, v.68, ed 4, p. 232–245, 2010

ALMAAS, H.; BERNER, V.; HOLM, H.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G. E. Degradation of whey from caprine milk by human proteolytic enzymes, and the resulting antibacterial effect against *Listeria monocytogenes*. **Small Ruminant Research**, v. 79, p. 11–15, 2008.

ALMAAS, H.; ERIKSEN, E.; SEKSE, C.; COMI, I.; FLENGSRUD, R.; HOLM, H. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 896–905, 2011.

ALMAAS, H.; HOLM, H.; LANGSRUD, T.; FLENGSRUD, R.; VEGARUD, G. E. In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 562–569, 2006.

ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; JÚNIOR, P. H. R.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T. CARVALHO, A.F. Whey: technologies for coproducts production, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.

ALVES F.S.F.; PINHEIRO, R.R. A importância do leite de cabra na nutrição humana, **Embrapa**; 2005. Disponível em: http://www.capritec.com.br/artigos_embra020829a.htm

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists Journal., Washington, USA, 2000.

ATTAALLAH, W.; YILMAZ, A. M.; ERDOĞAN, N.; YALÇIN, A. S.; AKTAN, A. O. Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. **Pathology and Oncology Research**, v. 4, p. 817–822, 2012.

BARBOSA, A.S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde**, v.5, n.1, p.7-25, 2010.

BATISTUZZO, J.A.O., ETO Y., ITAYA M.. **Formulário Médico - Farmacêutico**, Tecnopress, 3ª edição, 2006.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 320–338, 2010.

BOLACALI, M.; KÜÇÜK, M. Fertility and Milk Production Characteristics of Saanen Goats Raised in Muş Region. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 18, n. 3, p. 351-358, 2012.

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

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

BRANS, G.; SCHRÖEN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263–272, 2004.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa pecuária municipal-PAM, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº37 de 31 de outubro de 2000**. Aprova

o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, novembro de 2000.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola, Departamento de Crédito e Estudos Econômicos. **Informativo sobre a estiagem no nordeste – nº 114** de 30 de novembro de 2017.

BUENO, L. M. C. Leite de cabra – excelente alimento funcional. **Revista Leite e Derivados**, n. 83, p. 52-60, 2005.

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTRÖM, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membr. Science*, v. 280, p. 418–426, 2006.

CASTRO, G. A.; MARIA, D. A.; BOUHALLAB, S.; SGARBIERI, V. C. In vitro impact of a whey protein isolate (WPI) and collagen hydrolysates (CHs) on B16F10 melanoma cells proliferation. **Journal of Dermatological Science**, v. 56, p. 51–57, 2009.

CAMPOS, S. Leite de Cabra (Valor Nutritivo). Artigo de Revisão. **Revista Nutrição e Saúde**, v. 4, p. 12-13, 2005.

CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229–1240, 2006.

COATES, D. Molecules in focus: The angiotensin converting enzyme (ACE). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 769–773, 2003.

CONTRERAS, M.M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT Food Science and Technology**, v. 44, p. 9–15, 2011.

CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D.J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S.M.M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48–55, 2014.

CORREIA, L. F. M.; MAUBOUIS, J. L.; CARVALHO, A. F. Aplicações de membranas na indústria de laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 15, p. 74-78, 2011. Disponível em: <http://www.revistalaticinios.com.br/materias/revista-il-90/13_TecnologiaDeMembranas_Revista%20IL%2090.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2017.

COSTA, E.L.; ALMEIDA, A.R.; NETTO, F.M.; GONTIJO, J.A.R. Effect of intraperitoneally administered hydrolyzed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1817–1824, 2005.

DE MEJIA E.G.; DIA, V. P. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. **Cancer Metastasis**, v. 3, p. 511-528, 2010.

DE WIT, J. N. Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products. **European Whey Products Association**, n. 1, Bruxelas – Bélgica, 2001.

DEMERS-MATHIEU, V.; GAUTHIER, S. F.; BRITTEN, M.; FLISS, I.; ROBITAILLE, G.; JEAN, J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. **International Dairy Journal**, v. 28, p. 94–101, 2013.

DÍAZ-CASTRO, J.; LISBONA, F.; MORENO, M.; ALFÉREZ, M. J. M.; CAMPOS, M. S.; LÓPEZ-ALIAGA, I. Influence of Goat Milk on Iron Deficiency Anemia Recovery. **International Journal of Dairy Science & Processing**, v.2, n.1, p. 7-11. 2015.

DRAGONE, G. et al. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v.112, p.929-935, 2009.

DULLIUS, A; GOETTERT, M. I.; SOUZA, C. F. V. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up, **Journal of functional foods**, v.42, p. 58-74, 2018.

EGITO, A. S; ROSINHA, G. M. S; LAGUNA, L. E. ; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; Gaillard, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 5, p. 359–386, 2014.

FURLONG, S. J.; MADER, J. S.; HOSKIN, D. W. Bovine lactoferricin induces caspase independent apoptosis in human B-lymphoma cells and extends the survival of immune-deficient mice bearing B-lymphoma xenografts. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, p. 371-375, 2010.

GILFORD, J.L.; HUNTER, H.N.; VOGEL, H.J. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2588–2598, 2005.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v.51, n.1, p.155-163, 2004.

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

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 7-15, 2008.

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

HAMME, V.; SANNIER, F.; PIOT, J.M.; DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S. Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: Contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. **Journal of Dairy Research**, v. 76, p. 152–157, 2009.

HEJTMÁNKOVÁ, A.; PIVEC, V.; TRNKOVÁ, E.; DRAGOUNOVÁ, H. Differences in the composition of total and whey proteins in goat and ewe milk and their changes throughout the lactation period. **Czech Journal of Animal Sciency**, v. 57, p. 323–331, 2012.

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, p. 82–100, 2014.

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

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L.; Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino Acids**, v. 35, p. 257–265, 2008.

JOVANOVIĆ, S.; BARAC, M.; MAČEJ, O.; Whey proteins-properties and possibility of application. **Mljekarstvo - Journal for dairy production and processing improvement**, v. 55, p. 215–233, 2005.

KANDA, A.; NAKAYAMA, K.; FUKASAWA, T.; KOGA, J.; KANEGAE, M.; KAWANAKA, K.; HIGUCHI, M. Post-exercise whey protein hydrolysate supplementation induces a greater increase in muscle protein synthesis than its constituent amino acid content. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 981–987, 2013.

KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica de alimentos – Teoria e aplicações práticas. 1 edição. Editora Guanabara, 2008.

KONG, B.; PENG, X.; XIONG, Y.L.; ZHAO, X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1–2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 135, p. 540–547, 2012.

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

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437–447, 2009.

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

LACROIX, I.M.E.; LI-CHAN, E.C.Y. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7500–7506, 2013.

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

LOPES, M. C. S.; MIYAGI, E. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; FACÓ, O.; GUIMARÃES, R. F.; OSMAR, A. C. J.; MCMANUS, C. M. Spatialization of climate, physical and socioeconomic factors that affect the dairy goat production in Brazil and their impact on animal breeding decisions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1073-1081, 2012.

MACEDO, A. **Fracionamento de lactosoro de ovelha por tecnologias de membranas e estudos das possíveis utilizações dos concentrados obtidos**. 450 páginas. Tese de Doutorado - Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Portugal, 2010.

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

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

MARSHALL, K., 2004. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**. v. 9, p. 136–156, 2004.

MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; DE HAAN, E.H. Whey protein rich in alpha-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 1051–1056, 2002.

MCCULLOUGH, F.S.W. **Nutritional interest of goat's milk – Present information and future prospects.** In: International Symposium the future of the sheep and goat dairy sectors. Zaragoza, 2004.

MEDEIROS, G. K. V. V.; QUEIROGA, R. C. R E., COSTA, W. K. A.; GADELHA, C. A. A.; LACERDA, R. R.; LACERDA, J. T. J. G.; PINTO, L. S.; BRAGANHOL, E.; TEIXEIRA, F. C.; BARBOSA, P. P. S., CAMPOS, M. I. F.; GONÇALVES, G. F.; PESSÔA, H. L. F.; GADELHA, T. S. Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. **International Jornal of Functional Macromolecules**, 2018.

MICHAELIDEOU, A.; STEIJINS, J. Nutritional and technology aspects of minor bioactive components in milk and whey: growth factors, vitamins and nucleotides. **International Dairy Journal**, v. 16, p 1421-1426, 2006.

MODLER, W. Value-added components derived from whey. **American Dairy Science Association**, v.1, p. 1–33, 2009.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: MUZZALUPO, I. **Food Industry**, Itália: Editora InTech, 2013, cap. 24, p. 549-588.

MORALES, F. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, v. 72, p. 119-125, 2001.

MORRIS, P. E.; FITZGERALD, R. J. Whey proteins and peptides in human health. In: ONWULATA, C. I., HUTH, P. J. (Eds.), **Whey Processing, Functionality and Health Benefits**, p. 285–384, 2008.

NAIK, L.; MANN, B.; BAJAJ, R.; SANGWAN, R.B.; SHARMA, R. Process optimization for production of bio-functional whey protein hydrolysates: Adopting response surface methodology. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 19, p. 231–237, 2013.

OSMAN, A.A.; GODA H, A. B.; ABDEL-HAMID, M.C.; BADRAN, C. S. M., OTTE, J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65 p. 480-486, 2016.

PABOEUF, V. et al. Processo de fabricação de ricota por ultrafiltração. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 16, n. 92, p. 144-146, 2011.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1–14, 2007.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, p. 345–364, 2013.

PARODI, P.W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, p.813–828, 2007.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 141, p.73–81, 2010.

PATEL, S. Functional relevance of whey protein: a review of recent findings and scopes ahead, **Journal of functional foods**, v. 19, p. 308-319, 2015.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R.J.; O'BRIEN, N.M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643–654, 2009.

POWER, O.; FERNÁNDEZ, A.; NORRIS, R.; RIERA, F.A.; & FITZGERALD, R.J. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 38–47, 2014.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012.

RAJPUT, Y.S.; SHARMA, R.; MANN, B. Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. **Dairy Science Technology**, v. 93, p. 21–43, 2013.

RECIO, I.; DE LA FUENTE, M.A.; JUAREZ, M.; RAMOS, M. Bioactive components in sheep milk. In Y.W. Park (Ed.), **Bioactive components in milk and dairy products**, p. 83–104, 2009

REZAEI, H.; ASHTIANI, F.; FOULADITAJAR, A. Effects of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in cross-flow microfiltration of whey. **Desalination**, v. 274, n. 1-3, p. 262-271, 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G, JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, 127: 1-4, 2007.

RUTHERFURD, S.M. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. **Journal Of Aoac International**, v. 93, n. 5, 2010.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.

SGARBIERI, V. C., Artigo de Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

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

SHIN, H.S.; KIM, S.B.; KANG, S.C.; KHAN, M.A.; KIM, H.S.; SHIN, H.J., et al. Production of low antigenic cheese whey protein hydrolysates using mixed proteolytic enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2055–2060, 2007.

SILANIKOVE, N.; LEITNERB, G.; MERINC, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 110–124, 2010.

SILVESTRE, M.P.C.; SILVA, M.R.; SILVA, V.D.M.; SOUZA, M.W.S.; LOPES JUNIOR, C.O.; AFONSO, W.O. Analysis of whey protein hydrolysates: Peptide profile and ACE inhibitory activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 747–757, 2012.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource in Technology**, v.1, p. 1-11, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. **Internacional Dairy Journal**, v. 18, p. 695–704, 2008.

SOUSA, G. T. D.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; DE OLIVEIRA, E. P.; OYAMA, L. M.; SANTOS, R., V; PIMENTEL, G. D. Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: A review. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 67, 2012.

SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R.J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis, **International Dairy Journal**, v. 13, p.447-453, 2003.

TAVARES, T.; CONTRERAS, M.M.; AMORIM, M.; PINTADO, M.; RECIO, I.; MALCATA, F.X. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. **Peptides**, 32, 1013–1019, 2011.

TAVARES, T.G.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; PINTADO, M.E.; CARVALHO, J.E.; MALCATA, F.X. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 934–939, 2011.

THÉOLIER, J.; HAMMAMI, R.; LABELLE, P.; FLISS, I.; JEAN, J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 706–714, 2013.

TULIPANO, G.; COCCHI, D.; CAROLI, A.M. Comparison of goat and shee β -lactoglobulin to bovine β -lactoglobulin as potential source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 97–101, 2012.

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

YALCIN, A.S. Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 1637–1643, 2006.

YANGILAR, F. As a potentially functional food: goats' milk and products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 1, n. 4, p. 68–81, 2013.

WALSTRA, P. et al. Dairy science and technology. New York: Taylor & Francis Group, 768 páginas, 2006.

WALSTRA, P.; WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**, CRC Press, 2010.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; KRY, 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.

ZHANG, Q.X.; WU, H.; LING, Y.F.; LU, R.R. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 367–373, 2013.

ZHOU, D.; ZHU, B.; LU, Q.; WU, H.; LI, D.; YANG, J., et al. *In vitro* antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 148–154, 2012

5 RESULTADOS

ARTIGO 1

ANTIPROLIFERATIVE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY FROM WHEY PROTEINS OF GOAT MILK

CAMPOS, Maria Isabel Ferreira ^a; LIMA, Samantha Alves de ^c; BARBOSA, Paula Perazzo ^a; LOPES, José Honório ^a; CAMARGO, Laura Junqueira,^d PINTO, Luciano Da Silva^d. GADELHA, Carlos Alberto de Almeida ^b; SANTI-GADELHA, Tatiane ^b

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^b Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^c Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^d Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Corresponding author E-mail: santi.tatiane@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7436.

ABSTRACT

Whey is a dairy product usually discarded by the industry generating pollution to the environment, being necessary alternatives to provide their reuse. Among the whey components, proteins exhibit a high biological value and play an important role in the physiology of the organism. Therefore, the aim of this study was to identify the proteins present in the goat whey and evaluate their ability to perform antibacterial and anti-proliferative activity. The whey was obtained by acid coagulation, dialyzed and lyophilized to obtaining the concentrated protein. The identification of the protein was performed by SDS-PAGE and the antibacterial activity was evaluated against microorganisms *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, whereas the antiproliferative activity was carried forward to the human malignant melanoma cells. The results of the analysis show antibacterial different values of the minimum inhibitory concentration 15-120 µg.mL⁻¹ and percentage inhibition from 13 to

38% thereby observing the bacteriostatic ability of goat whey. Inhibition values were observed in cancer cell proliferation by 66.8%, suggesting that whey from goat milk has an important functional role in nutraceutical potential.

Keywords: microorganisms; by-product; proteomics; proteins; residue.

1 Introduction

Goat breeding for use of their milk has been observed in many countries around the world, since the goat milk has properties that differ from milk from other species such as the higher digestibility and lower allergenicity of its proteins [1 -3], the smaller size of its fat cells and the presence of short and medium chain fatty acids [4].

Whey is a by-product of the dairy industry which is obtained in large quantities mostly from the production of cheese, although there is production of significant amounts of whey occasionally this is discarded and is a product of high organic demand can pollute the environment [5].

The whey may be obtained by two process, by enzymes, clotting common in the manufacture of cheeses and by acid precipitation per addition of HCl [6]. Whey obtained from either process is characterized respectively as sweet whey and acid whey and has some differences in their composition, as the acid content, the amount of lactose and calcium [7].

The whey composition varies depending on factors that may interfere with the milk composition, such as the species of animal, the lactation stage, the animal feeding [8]. Basically, the whey consists of 93-94% water, lactose, soluble milk proteins, low content of lipids, calcium and vitamin B complex [9].

Despite the quality of the nutritional composition of whey there are limiting factors for the use of this *in nature* in the food industry, for example the high water content resulting in increased perishability of this by-product [10]. To overcome this obstacle and to avoid product loss, various processing techniques aimed at obtaining a whey concentrate sample compound are used drying methods such as spray drying and lyophilization [11].

Among the nutrients present in the whey, proteins has gained increasing prominence in research because of its technological and functional potential interest. Since whey proteins have all of the essential amino acids in larger or greater amounts than those recommended by the Food and Agriculture Organization - FAO these may play a biological role of great

interest in the physiology of the organism and may thus characterize the whey as a functional food like properties. [5]

Whey proteins are classified into major proteins: alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin and minority protein: lactoferrin, immunoglobulins, casein macropeptides among others. And some authors report that these proteins may play physiological effects on the nervous system, immune system, cardiovascular effects and protective microbial flora of the gastrointestinal tract [12; 13; 3; 14; 15].

The interest in discovering natural antibacterial lies in its possible use in the food industry to replace the synthetic chemical additives. While the importance of investigating natural metabolites that may positively affect the control and inhibition of proliferation of cancer cells. Thus demonstrating the potential nutraceutical present in the goat whey to act at different stages of cancer, and these initiation, promotion and progression. [16]

Therefore the aim of this study was to identify the proteins present in concentrate whey from goat milk and verify the biological activity in inhibiting the growth of microorganisms and cancer cell proliferation.

2 Material and Methods

2.1 Obtaining whey from milk

Goat's milk of the Alpine race with ± 120 days of lactation was obtained from the Campus III goat sector of the Federal University of Paraíba. The milk was skimmed and filtered to obtain whey according to the method described by Egypt et al., (2006) [17] with modifications where casein precipitated by adding 1 mol HCl. L⁻¹, to achieve pH 4.1. The whey obtained was centrifuged at 10,000 rpm / 20 min at 4 ° C to remove the residual fat and casein particles. For resolubilize the proteins, was added 1 mol NaOH. L⁻¹ until neutral pH ± 7.2 . Whey was dialyzed against water in dialysis membranes with pores of 8 kDa and finally frozen at -20 ° C and lyophilized to obtain the whey protein concentrate.

2.2 Soluble protein content

The soluble protein content was determined by the method described by Bradford (1976) [18], using bovine serum albumin - BSA as standard.

2.3 Total protein content

The amount of total protein in the whey was determined by the method described by AOAC, 2000 with some modifications [19].

2.4 Identification and characterization of proteins

Proteins present in the whey of goat's milk were identified by electrophoresis polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate SDS-PAGE (Loccus Biotechnology System Model: Vert-i10) according to the method of Laemmli (1970) [20].

The whey was dissolved in Tris-HCl 0.625 M buffer (pH 6.7, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and bromophenol blue 0.02%) and subjected to heating and centrifugation. The running buffer contained 0.2 M glycine; 0.025 M Tris, 10% SDS, pH 8.3.

At the end of the run, the gel was fixed in methanol, acetic acid and water (40/10/50 v / v) for 45 minutes, stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 0.005% overnight, the dye solution was removed with of 13% acetic acid.

The protein markers used have masses ranging 225-12 kDa (Amersham Rainbow Molecular Full Range ECL, GE Healthcare Life Sciences).

2.5 Antibacterial activity *in vitro*

The ability to inhibit bacterial growth was tested front of the strains *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, all this strains belonging to the collection of Biochemistry Laboratory of, Genetics and Radiobiology - BioGeR. The inoculum was standardized to Macfarland scale corresponding to approximately 0.5×10^7 CFU/mL⁻¹.

The whey samples were diluted in distilled water and filtered through a nylon filter with a diameter of 13 mm and 0.22 μ m pore. Then there was the serial dilution to determine the minimum inhibitory concentration - MIC and the classification of the potential of inhibition was performed according to the distribution described by Sartoratto, et al (2004) [21].

Where was added 100 μ L of brain heart infusion broth BHI- and 100 μ L of double concentrated sample in ELISA plates (enzyme-linked immunosorbent assay) with 96 flat bottom wells, and serial dilutions carried out. They were added 20 μ L of bacterial suspension (7.10 ± 10^6 CFU mL⁻¹) in each well. Readings were taken every minute over a period of 24 hours in GO Multiscan plate reader with absorbance at 625 nm.

The percentage of inhibition was calculated based on the comparison between the CIM and the control of bacterial growth curve according to the equation described by MALVEZZI, 2010 [22].

$$100 - \left(\frac{\text{abs (sample + bacterium)}}{\text{abs control}} \times 100 \right)$$

2.6 Antiproliferative Activity *in vitro*

To test the antiproliferative activity with strain A 375, human malignant melanoma, proteins and peptides were solubilized in ultrapure water, sterilized by membrane filtration. five dilutions were prepared with an initial concentration of 1 mg.mL⁻¹at least 60 µg.mL⁻¹. These dilutions were stored at -20 ° C until its use against tumor cells. and the tumor cell line used was the corresponding line A375 human malignant melanoma cells.

The antiproliferative activity *in vitro* was evaluated by observing the proliferation of tumor and non-tumor cell lines exposed for 24, 48 and 72 hours different concentrations of proteins. Cells were cultured in a microplate and after the tack time (24 h) were exposed to increasing concentrations of the sample and compared to a control group (treated with medium plus solvent).

Elapsed time of incubation, colorimetric assays were performed using tetrazolium salt (MTT) is made by reading optical density at 540 nm in a spectrophotometer. They were performed at least three independent assays for confirmation of results.

2.7 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate and data analysis of the antibacterial and anti-proliferative activity was the software used *GraphPad Prism version 6* by applying analysis of variance - ANOVA using post hoc from Dunnett's test multiple comparison to obtain the results of the antibacterial analysis and post hoc Tukey's test for analysis of data antiproliferative activity. For all analyzes were considered significant p <0.05.

3 Results And Discussion

3.1 Protein profile of goat whey

The quantity of total protein from goat whey concentrate corresponding to 72% and the soluble protein content of 0.64 mgP / mL, this result shows that whey proteins can be

resolubilized by up to 64% of the total, thereby they are active from a biological point of view. This is an important parameter, since the solubility of the protein is a crucial factor for employment in these biological processes such as immunomodulatory effects, antibacterial, antioxidants and others. [13,14]

The electrophoretic profile of goat whey is shown in Fig 1. Where the column A corresponds to the molecular weight marker and the B column of goat whey.

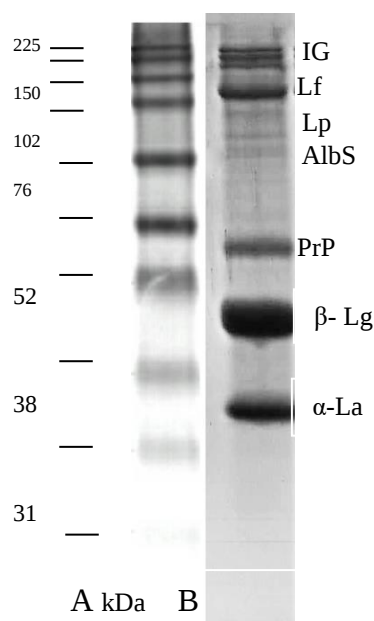


Figure 1. Analysis of a pool of goat milk whey proteins by SDS-PAGE gel electrophoresis (A) contains the profile of molecular mass markers in (B) whey proteins goat where IG (immunoglobulin), LF (lactoferrin), LP (lactoperoxidase), albs (serum albumin), proteoses peptone (PrP) β- lg (Beta lactoglobulin) and α-La (alpha lactalbumin)

This proteinaceous profile allows identifying the presence of proteins and by comparing the molecular mass of the markers and the masses reported in the literature was possible to verify the presence of the alpha-lactalbumin protein (± 20 kDa), the beta-lactoglobulin (± 26 kDa), proteases and peptones (± 34 kDa), serum albumin (± 52 kDa) of the enzyme lactoperoxidase system (± 60 kDa), lactoferrin (76kDa) and immunoglobulins (± 120 kDa).

The protein profile found in goat whey resembles that found by Dissanayake et al., 2013. The occurrence of increased intensity of bands related to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin agrees with the results found, and confirms the presence of these proteins in larger quantities compared with other proteins [23]

The display of the band corresponding to the proteases and peptones fractions are related to the method of isoelectric precipitation of goat whey. The lowering of the pH to the isoelectric point of casein, cause disruption of the β -casein and γ -casein fraction and these fragments can be observed in the remaining whey [13].

The immunoglobulins are present at this stage of lactation however, that protein is in highest concentration in colostrum whey from the milk, since the milk is responsible for conferring passive immunity to the calf. In the case of whey used in this study it was obtained from the milk of animals on the 4th month of lactation corresponding to mature milk is common in these cases that the whey contains amounts of immunoglobulins around 0.7 g / mL [5]. We can observe the presence of three distinct bands corresponding to the three kinds of Immunoglobulins present in the serum IgG, IgM and IgA.

3.2 Antibacterial activity *in vitro*

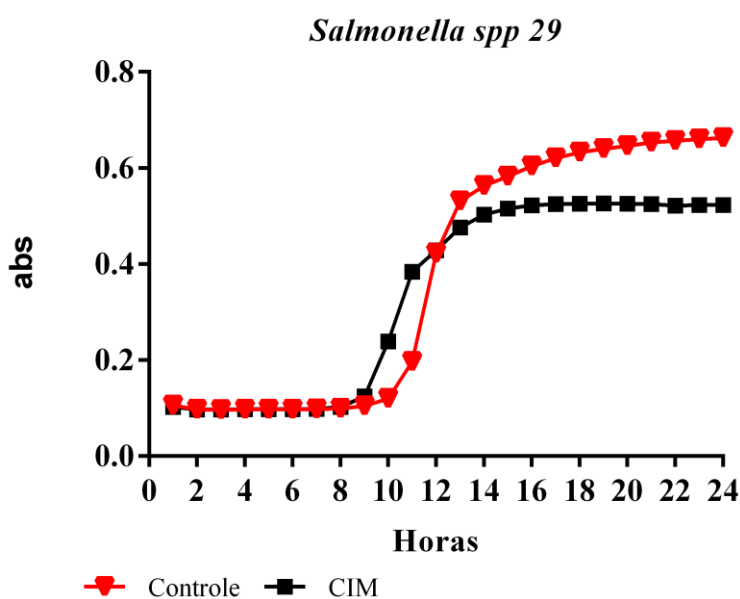
The need for researching antimicrobial coming from natural sources, such as goat milk, for example, is related largely to the occurrence of increased resistance of pathogens to antibiotics, in addition, there is a current tendency of the population to avoid the use of synthetic additives opting for foods with less preservatives. In this work were tested pathogenic bacterial strains 7, Table 1 shows the results of the inhibition percentage and the minimally inhibitory concentration MIC of the goat milk serum for the tested microorganisms.

Bacterium	CIM	% of inhibition
<i>Salmonella spp</i>	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	23,30
<i>Escherichia coli</i>	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	25,61
<i>Listeria monocytogenes</i>	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	39,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 912415D	15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32,02
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23235	120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	13,31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	23,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HSI2	15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	38,10

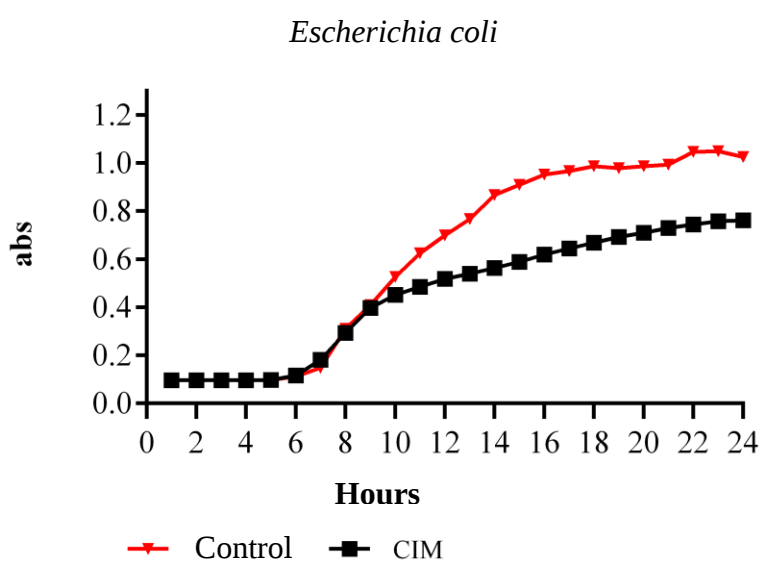
Table 1 Minimum Inhibitory Concentration - MIC and% inhibition of whey from goat milk

The results show that for all bacterial strains tested serum from goat milk was able to inhibit the growth of microorganisms and may thus be characterized as bacteriostatic capacity. The range of protein concentration related to the minimum inhibitory concentration values ranged from 120-15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ exhibiting activity for both Gram-positive bacteria and to Gram-negative bacteria.

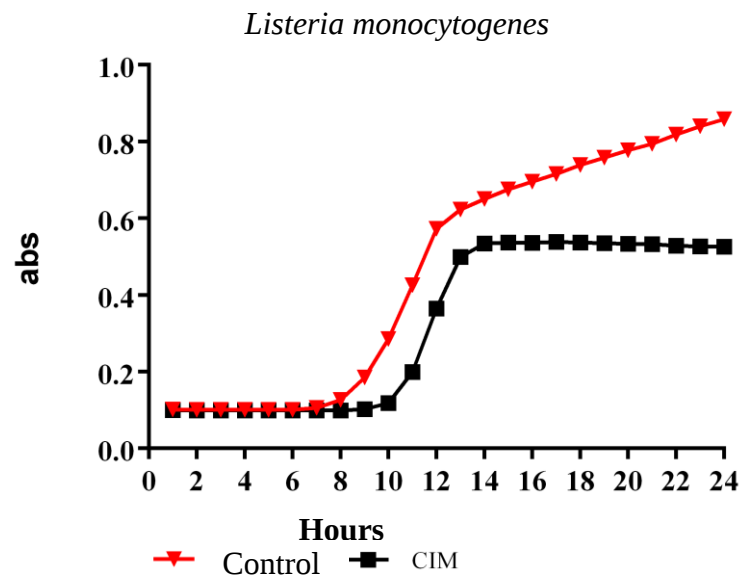
Graphs 1 to 5 represent bacterial growth control strain compared with experiments performed with serum from goat milk concentrate.



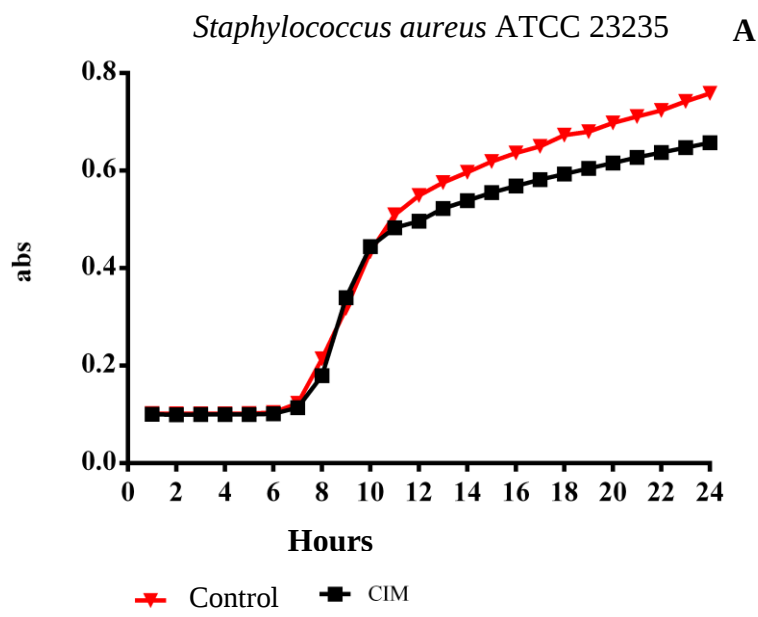
Graphic 1 Antibacterial activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Salmonella* spp. Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the Dunnet Test application.

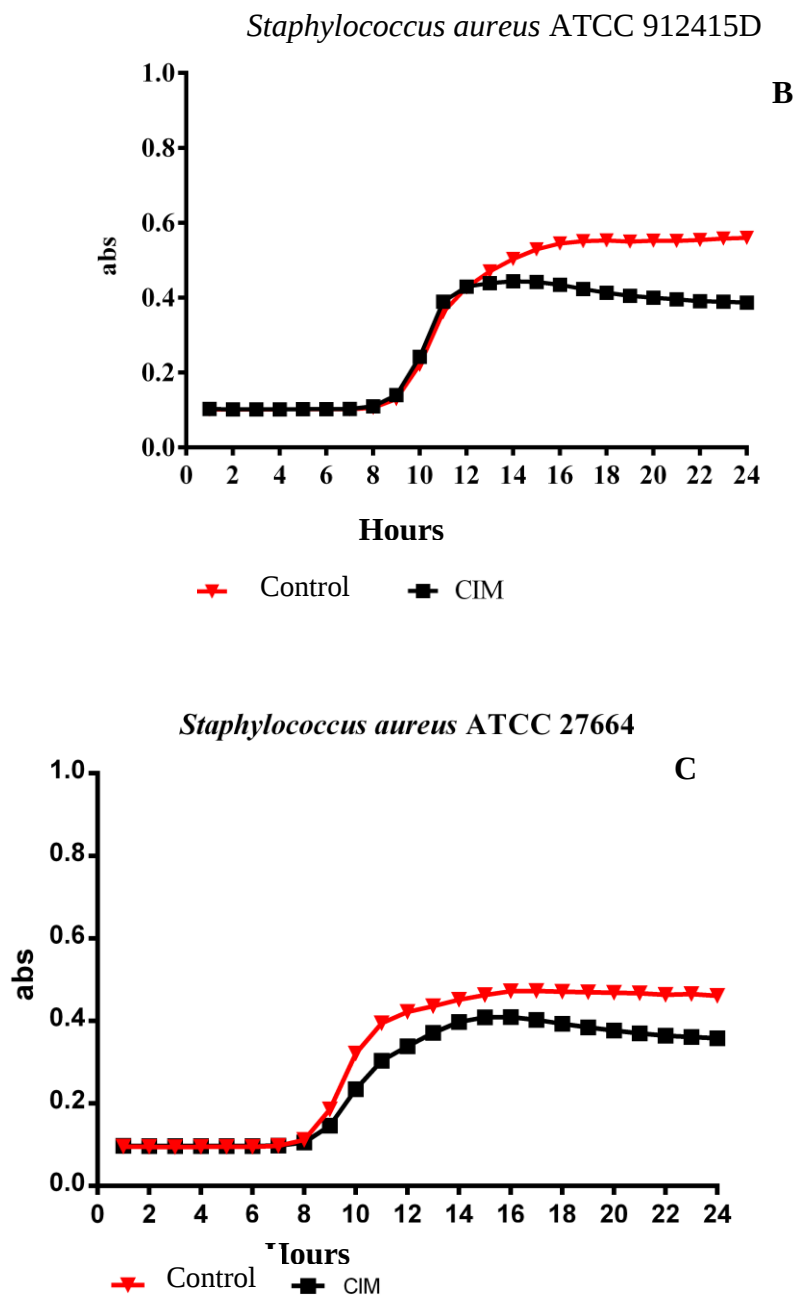


Graphic 2 Antibacterial Activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Escherichia coli* HSL1. Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the Dunnet Test application.



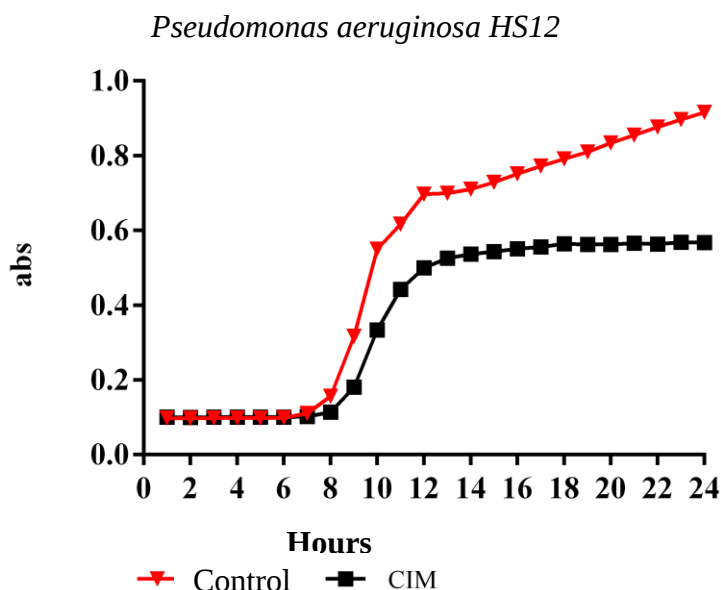
Graphic 3 Antibacterial Activity whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Listeria monocytogenes*. Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the Dunnet Test application.





Staphylococcus aureus ATCC 27664D

Graphic 4 Antibacterial Activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against different strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 23235(A), 912415D (B) and 27664D (C) Statistical differences were accepted when $p < 0.05$ from the application of the Dunnet Test.



Graphic 5 Antibacterial Activity of whey from goat's milk concentrated for 24 h against *Pseudomonas aeruginosa* HS12. Statistically significant differences were observed when $p < 0.05$ from Dunnet's test.

According to Graphic 1, we see that the first 8 hours of the experiment there was a proliferation of bacteria in the presence of the sample, while the control growth was observed after 10 hours of the experiment. This result can be explained by the bacteria's ability to use the whey for its own metabolism thus initiating its growth after this period the sample is replaced by action on the microorganism, control which is only the culture medium the strains presented delayed growth.

The ability of the goat whey proteins to inhibit the growth of microorganisms relates to electrostatic interactions between the membrane lipopolysaccharides of bacteria and the proteins present in whey. Another important feature is the amphipathic protein character, which after inserting the hydrophobic region of the membrane of the bacterium apolar core unbalances the bacterial cell homeostasis resulting in lysis of the bacterial cell wall [24].

The results shown in Table 1 infer that all bacteria tested had MIC with different percentage inhibition for Gram-positive bacteria, such as for Gram-negative bacteria. The ability to inhibit Gram-positive bacteria confirms the results found by Demers-Mathieu et al., 2013 [25] who observed more significant inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, Gram-positive bacteria, the test of hydrolysed whey proteins, although this author has verified low inhibition capacity for Gram-negative strains in the case of *Escherichia coli*.

The of goat whey proteins particularly demonstrated best inhibition percentage (25.6%) of *Escherichia coli* growth than camel whey proteins that exhibit a percentage inhibition of 22% for the same bacteria [26] .

A recent previous study demonstrated the ability of the proteins fractionated goat whey in inhibiting growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*, corroborating the results of this work. Although these authors have not observed growth inhibition of *Staphylococcus aureus* [27].

Thus it is important to emphasize the relevance of whey capacity goat concentrated to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Pseudomonas aeruginosa* once for being Gram-negative bacteria, they have greater resistance to antibiotics due to their morphological characteristics as lipopolissacaridea the presence of an outer membrane. In these cells the cell lysis procedure is correlated binding of proteins to the surface lipopolysaccharides, neutralizing them and causing the displacement of polyanionic divalent cations resulting in disruption of cellular plasma membrane. [24, 25]

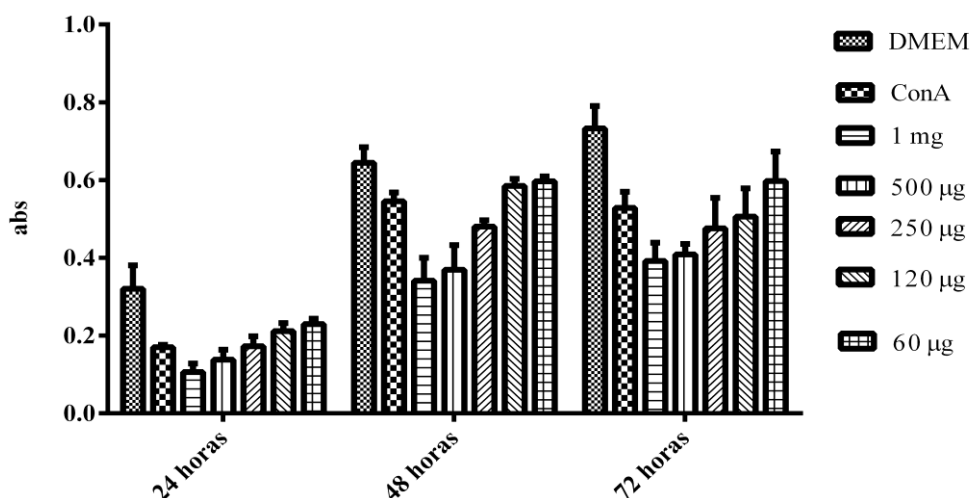
Among the proteins identified in the milk goat whey the presence of lactoferrin can be related to the antibacterial ability evident since this is a carrier protein capable of binding to iron and thus deprive the bacteria use it for growth. [28]

Sartoratto et al., to verify the ability of antimicrobial essential oils extracted from plants established reference values for antimicrobial activity. According to the author strong activity for MIC values are between 0:05 to 0:50 mg.mL⁻¹, moderate activity is to between 0.6 - 1:50 mg.mL⁻¹ and weak activity values up to 1.50 mg.mL⁻¹.

Thus according to the values found in this work it can be said that there was strong growth inhibition as the MIC values ranging from 0.015 to 0.120 mg.mL⁻¹ [29]. Among the best evaluated bacteria growth inhibition was observed for strains of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* ATCC 912415D.

3.3 Antiproliferative activity *in vitro*

The test results of *in vitro* antiproliferative activity of proteins from caprine whey is shown in Graphic 6. In this we can see that for 3 days growth the concentration of 1 mg.mL⁻¹ was the most effective in the inhibition of melanoma cell proliferation while MIC corresponded to the lowest tested concentration of 60 µg. For both concentrations there were variations in the inhibition percentage of these results are shown in Table 2.



Graphic 6 Antiproliferative activity of whey from goat's milk concentrated against human malignant melanoma cells lineage A375 for 72 hours. The differences were statistically accepted when $p < 0.05$ from the Tukey test.

		% of inhibition	Time (hours)
CIM₅₀	6 µg.mL ⁻¹	28,30	24
	6 µg.mL ⁻¹	7,410	48
	6 µg.mL ⁻¹	18,50	72
CL₅₀	1 mg.mL ⁻¹	66,80	24
	1 mg.mL ⁻¹	47,00	48
	1 mg.mL ⁻¹	46,00	72

Table 2 Cell proliferation inhibition values by time and concentration

Among the proteins found in whey, lactoferrin has obtained increased attention of research, since the results show their ability to inhibit intestinal tumors and possibly other tumor. It is believed that the action potential to give the activity of lactoferricin peptide (LFcin) derived from lactoferrin, which operates in several ways: induction of apoptosis, modulation of enzymes metabolizing carcinogens, blocking the cell cycle by modifying gene expression and preventing angiogenesis [16].

The goat whey ability to inhibit the proliferation of malignant melanoma cells is associated with significantly high amount of cysteine amino acid and cysteine from γ -glutamylcysteine and dipeptides, which are efficient substrates for glutathione synthesis [23].

Due to the significant increase in the incidence of cancer in the world, research has sought to find molecules that are able to act in order to reduce the proliferation of cancer cells. Once the diet may prove to be both an environmental risk factor for developing this disease, it can also be used as a prevention tool. [30]

In a previous study Attaallah et al., 2012 [31] demonstrated the occurrence of a smaller number of tumor foci was observed when the whey protein hydrolyzate compared to soy protein were provided to mice bearing colon cancer, indicating the whey protein is superior to other dietary proteins for suppression of tumor development.

4 Conclusions

The various proteins identified in serum of goat milk are capable of inhibiting the growth of microorganisms with different characteristics, although there are differences regarding the percentage inhibition. Reaffirming the importance of using natural antimicrobial and expanding the use of these possibilities for the industry. Furthermore, the goat whey proteins played an important role in inhibiting the proliferation of malignant cells, thus bringing a new perspective to use since the goat whey proteins have to important nutraceutical capabilities that should be explored adding biological and commercial value of this residue.

5 Acknowledgments

The authors thank CAPES-Coordination of Higher Education Personnel Training, the IDEP / UFPB- Research Development Institute and CNPq for funding this research. The goat sector Campus IV UFPB for giving the goat milk for the experiments andnd UFPel for their support in the conduct of anti-proliferative experiments.

6 Conflict of interest

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

REFERENCES

- [1] M. C. S. Lopes, E. S. Miyagi; M. C. S. Fioravanti, O. Facó, R. F. Guimarães, A. C. J. Osmar, C. M. Mcmanus, Spatialization of climate, physical and socioeconomic factors that affect the dairy goat production in Brazil and their impact on animal breeding decisions, *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32 (2012) 1073-1081.
- [2] K. M. Madureira, V. Gomes, W. P. Araújo, Physicochemical and cellular characteristics of milk from Saanen, Alpine and Toggenburg goats, *Revista brasileira de Ciência Veterinária*. 24 (2017) 39-43.
- [3] A. R. Madureira, T. Tavares, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, F. X. Malcata, Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins, *Journal of Dairy Science*. 93 (2010) 437–455.
- [4] J. Díaz-Castro, F. Lisbona, M. Moreno, M. J. M. Alférez, M. S. Campos, I. López-Aliaga, Influence of Goat Milk on Iron Deficiency Anemia Recovery, *International Journal of Dairy Science & Processing*. 2 (2015) 7-11.
- [5] J. S. S. Yadav, S. Yan, S. Pilli, L. Kumar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides, Review Article. *Biotechnology Advances*. 33 (2015) 756–774.
- [6] G. W. Smithers, Whey-ing up the options e Yesterday, today and tomorrow., *International Dairy Journal*. 48 (2015) 2-14.
- [7] V. Paboeuf, et al., Processo de fabricação de ricota por ultrafiltração, *Revista Indústria de Laticínios*, 16 (2011) 144-146.
- [8] M. Bolacali, M. Küçük, Fertility and Milk Production Characteristics of Saanen Goats Raised in Muş Region, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 18 (2012) 351-358.
- [9] G. W. Smithers, Whey and whey proteins-from ‘gutter-to-gold’, *Internacional Dairy Journal*. 18 (2008) 695–704.

[10] G. Brans, C. G. P. H. Schröen, R. G. M. Van Der Sman, R. M. Boom, Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges, *Journal of Membrane Science*. 243 (2004) 263–272.

[11] C. Mollea, L. Marmo, F. Bosco, Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: MUZZALUPO, I. Food Industry, Itália: EditoraInTech, 2013, cap. 24, p. 549-588.

[12] B. Hernández-Ledesma, M. Ramos, J. Á. Gómez-Ruiz, Bioactive components of ovine and caprine cheese whey, *Small Ruminant Research*, 101 (2011) 196–204.

[13] A. Macedo, Fraccionamento de lactosoro de ovelha por tecnologias de membranas e estudos das possíveis utilizações dos concentrados obtidos. 450 páginas. Tese de Doutorado - Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Portugal, 2010.

[14] A. R. Madureira, T. Tavares, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, F. X. Malcata; Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93 (2010) 437–455.

[14] B. Hernandez-Ledesma, I. Recio, L. Amigo, Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides, *Amino Acids*. 35 (2008) 257–265.

[15] A.S. Yalcin, Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides, *Current Pharmaceutical Design*. 12 (2006) 1637–1643.

[16] E.G. De Mejia, V.P. Dia, The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells, *Cancer Metastasis*. 3 (2010) 511-528.

[17] A.S. Egito, G. M. S. Rosinha, L. E. Laguna, L. Miclo, J. M. Girardet, J. L. Gaillard, Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58 (2006) 932-939.

[18] M.A. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*. 72 (1976) 248-254.

[19] AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists Journal., Washington, USA, 2000

[20] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4, *Nature*. 227 (1970) 680-685.

[21] A. Sartoratto, A.L.M. Machado, C. Delarmelina, G.M. Fig.ueira, M.C.T. Duarte, V.L.G. Rehder, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian J. Microbiol.* 35 (2004) 275–280. doi:10.1590/S1517-83822004000300001.

[22] K.M. Malvezzi, Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo do extrato bruto e suas associações. 114 páginas. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo, 2010

[23] M. Dissanayake, L. Ramchandran, O. N. Donkor, T. Vasiljevic, Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. *International Dairy Journal*. 31 (2013) 93-99.

[24] A. Brandelli, D. J. Daroit, A. P. F. Corrêa, Whey as a source of peptides with remarkable biological activities, A review. *Food Research International*. 73 (2015) 149–161.

[25] V. Demers-Mathieu, S. F. Gauthier, M. Britten, I. Fliss, G. Robitaille, J. Jean, Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration, *International Dairy Journal*. 28 (2013) 94–101.

[26] M. F. Gobbetti, C.G. Minervini, Rizzello, Angiotensin I-converting-enzymeinhibitory and antimicrobial bioactive peptides, *International Journal of Dairy Technology*. (2004) 173–188.

[27] B. Hernández-Ledesma, M. J. García-Nebot, S. Fernández-Tomé, L. Amigo, I. Recio, Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*.38 (2014) 82–100.

[28] Z. Jrad, H. El Hatmi, I. Adt, J. M. Girardet, C. Cakir-Kiefer, J. Jardin, P. Degraeve, T. Khorchani, N. Oulahal, Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins, *Dairy Science & Technology*.94 (2014) 205–224.

[29] G. K. V. V. Medeiros, R. C. R E. Queiroga, W. K. A. Costa, C. A. A. Gadelha, R. R. Lacerda, J. T. J. G. Lacerda, L. S. Pinto, E. Braganhol, F. C. Teixeira, P. P. S. Barbosa, M. I. F. Campos, G. F. Gonçalves, H. L. F. Pessôa, T. S. Gadelha, Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential, *International Jornal of Functional Macromolecules*.2018.

[30] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International Journal of Cancer*, 136 (2015) 359–386.

[31] W. Attaallah,, A. M. Yilmaz, N. Erdogʻan, A. S. Yalçin, A. O. Aktan, Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats, *Pathology and Oncology Research-POR*. 18(2012) 817–822.

ARTIGO 2

PEPTÍDEOS BIOATIVOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE DE CABRA

CAMPOS, Maria Isabel Ferreira; LIMA, Samantha Alves de; OLIVEIRA, Júlia Caju de; GADELHA, Carlos Alberto de Almeida e Santi-Gadelha, Tatiane.

RESUMO

O soro do leite caprino é um resíduo originado em grandes volumes pela indústria de laticínios que pode ser reutilizado por processos tecnológicos como a hidrólise. Esta tecnologia quando aplicada em proteínas causa alterações estruturais e pode gerar peptídeos de interesse tecnológico e/ou nutracêutico. A partir deste conhecimento temos como objetivo obter peptídeos com capacidade antioxidante a partir da otimização das condições de hidrólise enzimática por alteração dos parâmetros tempo da reação e pH do meio. O soro do leite foi obtido a partir de precipitação ácida, centrifugado, ressolubilizado, dialisado e liofilizado. Para a hidrólise os parâmetros temperatura, concentração enzima:substrato foram mantidos constante para os 14 experimentos. A identificação do perfil dos peptídeos foram analisados por gel Tricina SDS-PAGE, o grau de hidrólise das proteínas foi avaliado pelo método de OPA. Os testes da atividade antioxidante foram analisados pelos métodos DPPH e ABTS. Os resultados obtidos inferem que o tempo da reação foi o parâmetro que interferiu de forma principal na hidrólise, onde os experimentos carregados com pepsina e tripsina por 150 min apresentaram melhor perfil peptídico e capacidade antioxidante de capturar o radical ABTS. Este estudo evidencia a importância de otimização das condições da reação hidrolítica para melhorar a qualidade funcional dos hidrolisados obtidos e assim gerar produtos tecnológicos e/ou farmacêuticos com maior potencial.

Palavras-chaves: bioatividade; alimento funcional; DPPH; ABTS; parâmetros de hidrólise

INTRODUÇÃO

A funcionalidade de um alimento é baseada na capacidade do alimento desempenhar atividades fisiológicas benéficas ocasionando assim melhor qualidade de vida e promoção da saúde. [1]

Dentre os componentes alimentares as proteínas de origem animal, em especial as proteínas do leite tem ganhado destaque no estudo de suas funcionalidades. Dentre esses, os

leites provenientes de ovinos e caprinos tem ganhado destaque pela capacidade funcional atribuída à sua composição [2].

O leite caprino é um alimento que além de apresentar um alto valor nutricional, as proteínas que fazem parte da sua composição são de alto valor biológico e desempenham importante papel na regulação de diversos processos metabólicos [3]

As proteínas do leite são divididas em dois grandes grupos, as caseínas que representam cerca de 80% e as do soro que correspondem a aproximadamente 20% do total. As proteínas do soro do leite são compostas por uma mistura proteica heterogênea que apresentam diferenciações químicas, físicas, estruturais e funcionais. As proteínas do soro são classificadas de acordo com a sua quantidade como majoritárias: alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina; e minoritárias: lactoferrina, lisozima, proteases peptonas, macropéptidos de caseína, sistema enzimático lactoperoxidase e imunoglobulinas [4,2].

O soro do leite embora seja obtido em grandes volumes principalmente pela fabricação de queijos por muitos anos foi considerado um resíduo da indústria de laticínios sem valor comercial e nutricional e constantemente descartado pelas indústrias. Porém a funcionalidade de suas proteínas amplia um novo leque de possibilidades para sua reutilização [5].

Dentre as diversas atividades biológicas *in vitro* que podem ser desencadeadas pelas proteínas do soro estão às atividades imunomodulatórias, antimicrobianas, citomoduladoras, agonistas e antagonistas opióides, quelação de íons, inibidores de apetite, modulação da microbiota intestinal, anti-hipertensiva, antioxidante e antitrombóticas [6].

A característica funcional das proteínas do soro do leite frequentemente está relacionada à liberação de peptídeos bioativos, presentes na sequência proteica nativa e que somente passam a apresentar atividade quando hidrolisados por processos específicos, tais como a digestão gastrointestinal, processamentos tecnológicos como a fermentação ou a hidrólise ácida e por enzimas de diferentes origens (microbianas, animais e vegetais) [5, 7].

A reação hidrolítica pode ser afetada por diversos parâmetros que vem a interferir na atividade enzimática, tais como a temperatura da reação, o tempo de hidrólise, o pH da solução, a concentração enzima/ substrato e a quantidade de enzima. Todos estes parâmetros podem ser alterados de forma a proporcionar a melhor eficácia da reação visando à obtenção de melhores atividades biológicas. [8, 9] Dessa forma o objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar as condições de hidrólise a partir da variação dos parâmetros pH e tempo da reação de forma a

potencializar a obtenção de hidrolisados com maior grau de hidrólise e maior potencialidade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do leite do soro do leite caprino

O leite utilizado nesse estudo foi cedido pelo centro de Caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba, localizado na cidade de Bananeiras – PB. O leite foi filtrado para retirada de substâncias interferentes e em seguida desnatado para seguir-se à obtenção do soro do leite por precipitação ácida e separação das micelas de caseína segundo a metodologia descrita por Egito et al., (2006) [10] com modificações.

O pH do leite foi ajustado para 4.1 a partir da adição de HCl 1 mol . L⁻¹, após a separação do sobrenadante do precipitado caseínico o soro do leite foi centrifugado (10.000 rpm/20 mins/4 °C) para retirada de frações residuais de caseína e de gordura. O pH foi reajustado para 7.1 pela adição de NaOH 1 mol . L⁻¹ e dialisado contra água em membranas de diálise com poros de 8 kDa, congelado a -20 °C e liofilizado para obtenção do concentrado proteico.

Preparação dos hidrolisados enzimáticos do soro do leite caprino concentrado

A hidrólise das proteínas do soro do leite caprino foi realizada segundo a metodologia descrita por Ahmed et al. (2015) [11] com modificações. Para esta análise foram preparados catorze (14) hidrolisados com as seguintes variações de parâmetros: tipo da enzima, pH do meio e tempo da reação. A Tabela 1 mostra os parâmetros usados para preparação dos experimentos, determinados a partir da realização de delineamento fatorial do tipo 2² com 3 repetições no ponto central.

O concentrado do soro do leite foi diluído com água ultrapura a partir da proporção 10:1 (peso/volume) e o pH foi ajustado de acordo com os diferentes tratamentos a partir da adição de NaOH 1 mol . L⁻¹ e HCl 1 mol . L⁻¹. As amostras foram colocadas sob agitação em incubadora *Shaker* de bancada com plataforma de movimento orbital sob temperatura constante de 37 °C para todos os experimentos. Em seguida as enzimas foram adicionadas a partir da correlação de enzima:substrato 1:50.

Para separação da fração hidrolisada da proteína intacta, após o termino do tempo de hidrólise, a reação enzimática foi interrompida em banho-maria a 100 °C durante 5 min

seguido de centrifugação das amostras (7000 rpm/5min). As amostras foram então congeladas a -20 °C e liofilizadas.

Tabela 1 Planejamento estatístico dos hidrolisados do soro do leite caprino

Tratamento	Tipo de enzima	pH	Tempo da reação (min)
1	Pepsina	1,5	90
2	Pepsina	2,5	90
3	Pepsina	1,5	150
4	Pepsina	2,5	150
5	Pepsina	2,0	120
6	Pepsina	2,0	120
7	Pepsina	2,0	120
8	Tripsina	6,5	90
9	Tripsina	7,5	90
10	Tripsina	6,5	150
11	Tripsina	7,5	150
12	Tripsina	7,0	120
13	Tripsina	7,0	120
14	Tripsina	7,0	120

Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados proteicos

As proteínas e peptídeos foram identificados a partir das suas massas moleculares pela técnica PAGE- SDS- Tricina segundo a metodologia de Schägger; Von Jagow (1987) [12], utilizando 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%).

As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,02%, aquecidas em estufa a

100 °C/ 10 min e centrifugadas por 5 minutos e aplicado alíquotas de 25 µL nos poços do gel de empilhamento.

Após o final da corrida o gel foi fixado em solução de metanol, ácido acético e água (5/1/4), durante 1 h, corado com solução de Coomassie brilliant blue G-250 0,025% em ácido acético 10% durante 48 h. O corante foi removido com solução de ácido acético 10%.

Os marcadores proteicos utilizados como padrões apresentavam massas moleculares de 38, 31, 24, 17, 12, 8.5, 3.5 kDA (Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range, GE Health care Life Sciences)..

Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise dos catorze experimentos foi determinado pelo método de OPA-ortophtaldideído a partir da metodologia descrita por Spellman, (2003) [13]. Alíquotas de 1 mg foram diluídas em água, adicionadas ao reagente OPA (metanol, β-mercatoeptanol, SDS a 20%, tetraborato de sódio 10mM) deixadas em repouso por 2 min e realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm.

Determinação da atividade antioxidante

A partir da obtenção do grau de hidrólise dos experimentos, as amostras que apresentaram o maior grau de hidrólise foram testadas quanto a sua atividade antioxidante a partir da metodologia baseada na capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) utilizando os radicais ABTS método descrito por Rufino et al., 2007 [14] e DPPH método descrito por Morales e Jiménez-Pérez et al., 2001 [15], métodos que detectam transferências de elétrons e transferência de átomos de hidrogênio respectivamente.

As amostras liofilizadas foram diluídas na proporção de 1 mg.mL⁻¹, 1,5 mg.mL⁻¹ e 1,5 mg.mL⁻¹ em água ultrapura. Às amostras foram adicionados 1,5 mL de ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico). Os sistemas foram homogeneizados em vórtex, após 6 minutos, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm. Os resultados serão expressos em percentual de atividade antioxidante de cada amostra e comparando a curva-padrão de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), usado como controle positivo e água ultra pura como controle negativo.

Para o método DPPH seguiu-se a mesma preparação da amostra e foi adicionado 750µL de DPPH (2,2- Difenil-1- picrilhidrazilo). Os sistemas foram homogeneizados em

agitador, incubados sob agitação por 90 minutos com temperatura entre 20-25°C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14500 rpm. A leitura das amostras foram feitas em espectrofotômetro a 600nm. Os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante de cada amostra comparando-se a uma curva-padrão de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) usado como controle positivo e água ultrapura como controle negativo.

O percentual de inibição antioxidante foi calculado em função da atividade antioxidante das amostras em comparação com Trolox como padrão de referência dos dados usando a seguinte equação descrita por Naik (2013) [16] :

$$\% \text{ antioxidante} = \frac{\text{Absorbância do Controle} - \text{Absorbância das Amostras}}{\text{Absorbância do Controle}} \times 100$$

Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O planejamento estatístico foi analisado quanto a sua significância utilizando o software *Statistic* e aplicado o Diagrama de Pareto para identificação da influencia das variáveis. Os resultados da atividade antioxidante foram analisados utilizando o software *Graphpad Prisma version 6* através da aplicação da Análise de variância - ANOVA utilizando o pós-teste de Tukey para determinação de diferenças estatísticas. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 contem os resultados referentes ao grau de hidrólise dos experimentos realizados. O modelo experimental utilizado apresentou ser significativo podendo verificar que o parâmetro tempo e a interação entre tempo x pH foram os parâmetros que exerceram maior efeito nas condições de hidrólise, Naik et al., 2013 [16] afirma que o tempo da reação é um parâmetro que influencia na extensão final da hidrólise e vem a potencializar os efeitos de outros parâmetros aplicados na reação hidrolítica.

O grau de hidrólise é um parâmetro importante para a aplicação industrial dos hidrolisados proteicos. Agyei et al., 2016 [17] afirma que hidrolisados com baixo GH (< 10%) gera peptídeos com características tecno-funcionais específicas como agentes espumantes, emulsificantes e geleificantes. Enquanto que são necessários valores altos de GH (> 10%) para ocasionar a formação de peptídeos bioativos. De acordo com o exposto na tabela 1, todos

os experimentos obtiveram valores elevados de grau de hidrólise podendo exercer diferentes funcionalidades biológicas.

Tabela 2 Grau de hidrólise dos diferentes tratamentos de hidrólise das proteínas do soro do leite de cabra

Hidrolisados	Tipo de enzima	pH	Tempo da reação (min)	Grau de Hidrólise %
1	Pepsina	1,5	90	25,34
2	Pepsina	2,5	90	26,60
3	Pepsina	1,5	150	30,06
4	Pepsina	2,5	150	30,50
5	Pepsina	2,0	120	35,62
6	Pepsina	2,0	120	35,23
7	Pepsina	2,0	120	35,81
8	Tripsina	6,5	90	24,86
9	Tripsina	7,5	90	26,71
10	Tripsina	6,5	150	32,45
11	Tripsina	7,5	150	31,51
12	Tripsina	7,0	120	37,21
13	Tripsina	7,0	120	36,98
14	Tripsina	7,0	120	37,54

A tabela 2 mostra que os tratamentos que melhor apresentaram taxas de hidrólise foram os hidrolisados de tripsina e pepsina por 120 minutos. Corroborando com este resultado a Figura 1 traz o perfil peptídico destes hidrolisados, onde pode ser evidenciado bandas de proteínas de baixo peso molecular inexistentes na amostra intacta.

Naik et al., 2013 [16] observou um perfil eletroforético semelhante para hidrolisados da proteína do soro do leite bovino usando tripsina. Este autor observou a ocorrência de peptídeos abaixo de 8kDa concomitantemente ao não aparecimento da banda referente a beta-lactoglobulina sugerindo que houve hidrólise completa desta proteína. Estes resultados corroboram com os encontrados no perfil eletroforético mostrando que neste experimento o houve surgimento de bandas entre de 8 e 3,5 kDa.

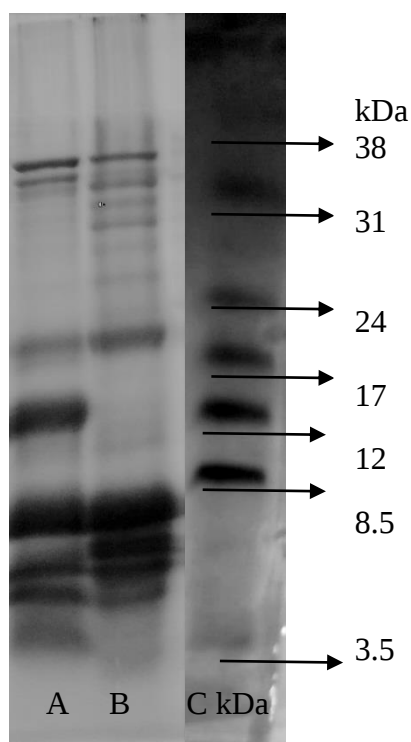


Figura 1 Perfil peptídico das amostras de soro de leite caprino obtido pela ação das enzimas pepsina e tripsina por 120 min. A: Hidrolisados de pepsina por 120 mins; B: Hidrolisados de tripsina por 120 mins; C: marcador de massa molecular.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

As figuras 2 e 3 mostram os resultados do teste antioxidante pelo método ABTS e pelo método DPPH, respectivamente. Os testes foram realizados com 3 concentrações distintas de proteínas, 1,5 mg, 2mg e 3 mg e com os hidrolisados que apresentaram maior grau de hidrólise, sendo estes os experimentos com pepsina e tripsina, por 120 e 150 mins, nos valores de pH de 2,5; 2,0; 7,0 e 7,5, correspondente aos experimentos 4, 7, 10 e 14.

Os resultados observados da atividade antioxidante para os hidrolisados proteicos corroboram com o observado na Tabela 1, uma vez que as amostras que exerceram melhor efeito foram aquelas que apresentaram o maior grau de hidrólise Figura 2 (B) e (D), justificando assim a escolha de tais amostras para as atividades. O potencial de oxidação teve maior evidência para o teste de ABTS para as amostras, dos Hidrolisados de pepsina em condições de pH 2/ por 120 min na concentração de 1,5 e 2 mg.mL⁻¹ (38,15 e 37, 63 % de inibição respectivamente).

A capacidade antioxidante dos peptídeos do soro de leite está relacionada a mecanismos de ação que envolvem a inativação das espécies reativas do oxigênio e limpeza dos radicais livre. Hernández-LEDESMA et al., 2008 [18], afirma que os peptídeos antioxidantes geralmente são resultado da hidrólise de beta-lactoglobulina [19, 20].

O modo de ação vai ser influenciado de acordo com a composição de aminoácidos e a sequência dos peptídeos. Portanto, levando em consideração a variabilidade de peptídeos e de aminoácidos presentes nos hidrolisados, torna-se imprescindível avaliar a capacidade antioxidante por diferentes métodos [21].

Ainda de acordo com as Fig.2 e 3 podemos observar baixo potencial antioxidante do soro do leite concentrado, este resultado reafirma a importância da hidrólise das proteínas proporcionando a consequente liberação de peptídeos bioativos capazes de exercer atividade antioxidante.

Os resultados deste estudo corroboram com o encontrado por Conway et al. (2013) [22] que observou a capacidade antioxidante importante em hidrolisados da proteína do soro do leite quando comparados a hidrolisados de caseína. Este autor afirma que a capacidade do soro do leite exercer efeito antioxidante está relacionado à capacidade destas proteínas serem doadoras de cisteína, um aminoácido precursor da glutatona, um antioxidante hidrossolúvel.

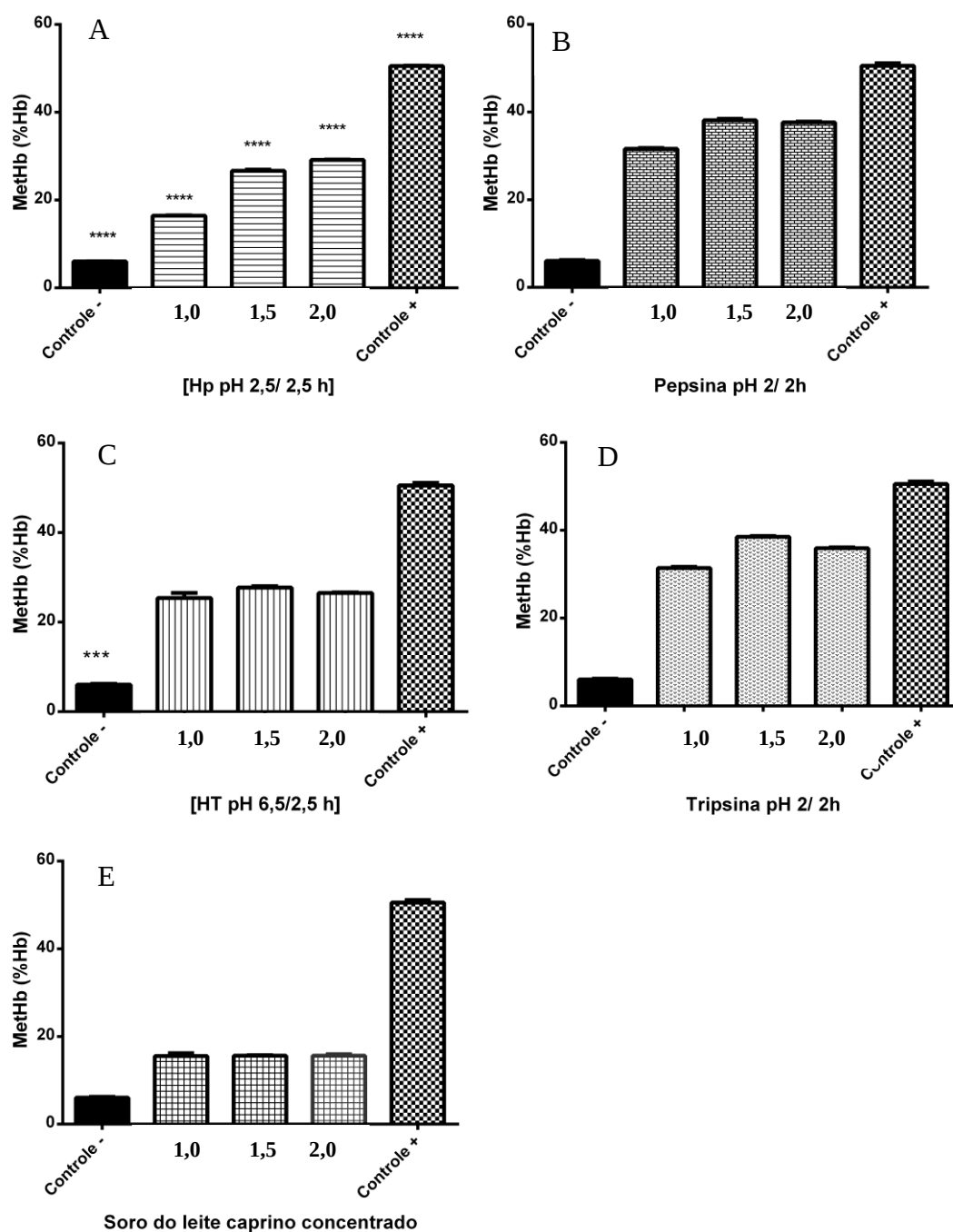


Figura 2 Atividade antioxidante dos hidrolisados testados em diferentes concentrações pelo método ABTS. (A) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando pepsina sob condições de pH 2,5/ 150 min. (B) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando pepsina (HP) sob condições de pH 2/ 120 min. (C) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 6,5/ 150 mins. (D) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 7/ 120 mins. (E) Atividade antioxidante do soro do leite caprino concentrado. Os resultados são comparados com o controle positivo. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de comparações pelo teste de Tukey onde $p < 0,0001$

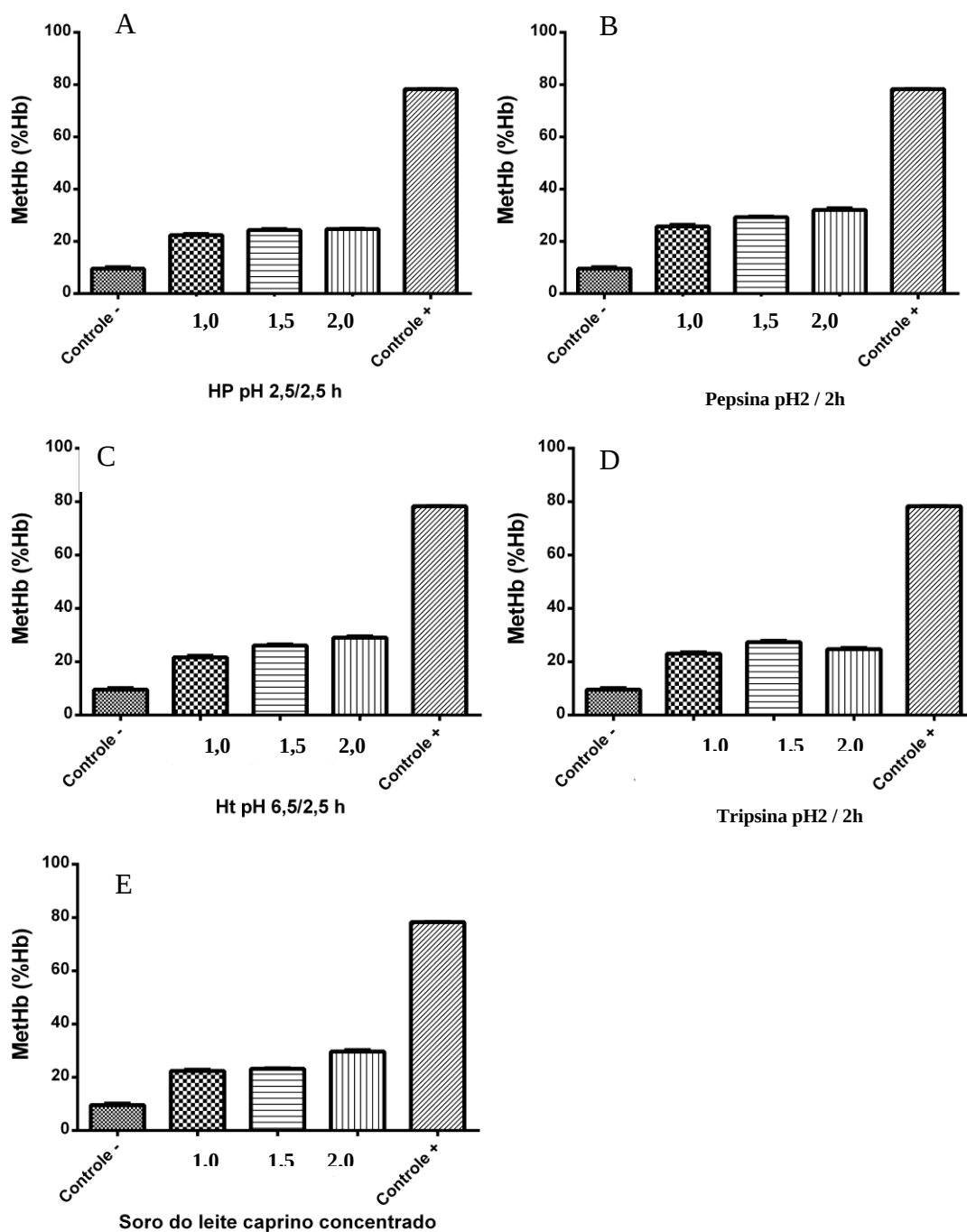


Figura 3 Atividade antioxidante dos hidrolisados testados em diferentes concentrações. (A) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando pepsina sob condições de pH 2,5/ 150 mins. (B) Atividade antioxidante do Hidrolisado utilizando pepsina sob condições de pH 2/ 120 mins. (C) Atividade antioxidante do Hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 6,5/ 150 mins. (D) Atividade antioxidante do hidrolisado utilizando tripsina sob condições de pH 7/ 120 mins. (E) Atividade antioxidante do soro do leite caprino concentrado. Os resultados são comparados com o controle positivo. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de comparações pelo teste de Tukey onde $p < 0,0001$

CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo podemos observar a importância de otimizar as condições de hidrólise das proteínas do soro do leite de cabra podendo assim identificar os parâmetros que podem interferir nos resultados do processamento. Neste trabalho a variável tempo da reação foi vista como mais interferente nos hidrolisados obtidos.

Além disso, a importância de otimizar estas condições refletiu no melhor grau de hidrólise, melhor perfil peptídico e na obtenção de peptídeos bioativos com melhor capacidade antioxidante. Podendo assim afirmar que o soro do leite de cabra hidrolisado é uma importante fonte de proteínas bioativas.

REFERÊNCIAS

- [1] MCINTOSH PB, FRENKIEL T.A.; WOLLBORN U.; MCCORMICK J.E.; KLEMPNAUER K.H.; FEENEY J.; CARR M.D. Solution structure of the B-Myb DNA-binding domain: a possible role for conformational instability of the protein in DNA binding and control of gene expression. **Biochemistry** v. 37, p. 9619-29, 1998.
- [2] HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J. Á. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 196–204, 2011.
- [3] SMITHERS, G. W., Whey-ing up the options e Yesterday, today and tomorrow., **International Dairy Journal**, v. 48, p.2-14, 2015.
- [4] YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI R. D; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. Review Article. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 756–774, 2015.
- [5] DULLIUS, A; GOETTERT, M. I.; SOUZA, C. F. V. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up, **Journal of functional foods**, v.42, p. 58-74, 2018.
- [6] TAVARES, T. G; AMORIM, M.; GOMES D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C.D.;MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journal of Food Engineering** ,v.110, p. 547–552, 2012
- [7] MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X.; Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 437–455, 2010.
- [8] C.O.; AFONSO,W.O. Analysis of whey protein hydrolysates: Peptide profile and ACE inhibitory activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 747–757, 2012.
- [9] GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E.M. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineer**, v.72, p.398- 405, 2006.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, n. 1, v. 2, p. 368-79, 1987
- [13] SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R.J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis, **International Dairy Journal**, v. 13, p. 447-453, 2003.
- [14] RUFINO, M. S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G, JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, 127: 1-4, 2007.
- [15] MORALES, F. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, v. 72, p. 119-125, 2001.
- [16] NAIK, L.; MANN, B.; BAJAJ, R.; SANGWAN, R.B.; SHARMA, R. Process optimization for production of bio-functional whey protein hydrolysates: Adopting response surface methodology. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 19, p. 231–237, 2013.
- [17] AGYEI, D.; ONGKUDON, C. M.; WEI, C. Y.; CHAN, A. S.; DANQUAH, M. K. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and Bioprocess Processing**, v. 98, p. 244–256, 2016.
- [18] HERNANDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L.; Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino Acids**, v. 35, p. 257–265, 2008.
- [19] ZHOU, D.; ZHU, B.; LU, Q.; WU, H.; LI, D.; YANG, J., et al. *In vitro* antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, p. 148–154, 2011
- [20] SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.
- [21] PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R.J.; O'BRIEN, N.M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643–654, 2009.
- [22] CONWAY, V., GAUTHIER, S.F., & POULIOT, Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 364–372, 2013

PATENTE

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SORO DO LEITE CAPRINO CONCENTRADO, COM 64% DE PROTEÍNA SOLÚVEL E BIOATIVA COM CAPACIDADE DE INIBIR A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MALIGNAS”

CAPÍTULO DE LIVRO

SORO DO LEITE DE CABRA: UMA REVISÃO SOBRE SEUS ASPECTOS
NUTRICIONAIS, BIOLÓGICOS E BIOFUNCIONALIDADES

CAPÍTULO 23

SORO DO LEITE DE CABRA: UMA REVISÃO SOBRE SEUS ASPECTOS NUTRICIONAIS, BIOLÓGICOS E BIOFUNCIONALIDADES

Maria Isabel Ferreira CAMPOS¹
Paula Perazzo de Souza BARBOSA²
Valgrícia Matias de SOUSA³
Dr^a Tatiane Santi Gadelha⁴

¹Mestranda do programa de pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, PPGCTA - UFPB; ²Doutoranda do programa de pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, PPGCTA - UFPB; ³Graduanda do curso de Farmácia/UFPB; ⁴ Orientadora/Professora do DBM/ UFPB;
belcampos.va@gmail.com

RESUMO: O leite de cabra é um alimento de elevado valor nutricional e tecnológico, com características particulares quando comparado a outros tipos de leite. A Paraíba tem grande destaque na produção nacional deste tipo de leite, devido ao clima e solo favoráveis a criação desses ruminantes, o que possibilita o desenvolvimento de pesquisas que possam agregar valor a este alimento em potencial. A composição do leite de cabra apresenta água, gorduras, lactose, caseínas e proteínas solúveis, também conhecidas como proteínas do soro do leite. Estas podem ser separadas do leite a partir de processamentos tecnológicos específicos. O soro do leite é um subproduto da indústria de laticínios que vem ganhando destaque nas pesquisas devido a sua obtenção em grandes volumes e ao potencial funcional que vem sendo atribuído aos seus componentes. Dentre estes, as proteínas presentes no soro vêm sendo estudadas por serem capazes de desempenhar importantes funções no organismo. A biofuncionalidade das proteínas do soro em muito está

One, Giselle Medeiros da Costa. O59n Nutrição e saúde: os desafios do mundo contemporâneo, 1. Giselle Medeiros da Costa One; Adriana Gomes Cézar Carvalho (Orgs.). –João Pessoa – PB. IMEA, 2018 82 fls. Prefixo editorial: 53005 ISBN: 978-85-53005-01-7 (on-line) Modelo de acesso: Word Wibe Web <http://www.cinasama.com.br> Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA – João Pessoa - PB 1. Ciências e Tecnologia dos alimentos 2. Segurança Alimentar 3. Bioquímica dos alimentos I. Giselle Medeiros da Costa One II. Adriana Gomes Cézar Carvalho III. Nutrição e saúde: os desafios do mundo contemporâneo, 1 IMEA CDU: 612.3
--

Laureno Marques Sales, Bibliotecário especialista. CRB -15/121

Direitos desta Edição reservados ao Instituto Medeiros de Educação Avançada
Impresso no Brasil / Printed in Brazil

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS BIOATIVAS PRESENTES
NO SORO DO LEITE DE CABRA SORO DO LEITE DE CABRA

CAPÍTULO 33

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS BIOATIVAS PRESENTES NO SORO DO LEITE DE CABRA

Valgrícia Matias de SOUSA¹
Maria Isabel Ferreira CAMPOS²
Paula Perazzo de Souza BARBOSA³
Dra. Tatiane Santi GADELHA⁴

¹Graduanda do curso de Farmácia/UFPB;

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFPB;

³Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFPB;

⁴Orientadora/Professora do DBM/UFPB.

valgricia_@hotmail.com

RESUMO: A cadeia de produção de alimentos é suscetível a falhas que podem acarretar doenças aos consumidores devido à presença de micro-organismos patogênicos. Alguns alimentos, como o soro do leite podem ser capazes de inibir o crescimento desses micro-organismos. O objetivo desse estudo foi identificar e avaliar a atividade antimicrobiana das proteínas do soro de leite de cabra frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. O soro do leite utilizado foi obtido da fabricação de queijo minas frescal, a partir de leite de cabra adquirido do setor caprinocultura da UFPB. O soro foi centrifugado e separado em duas partes: uma foi dialisada contra água destilada por 24h; a outra submetida à precipitação com sulfato de amônio em três frações: 0-30%, 30-60% e 60-90%. O teor de proteínas solúveis nas amostras foi quantificado através do método de Bradford, onde se verificou 2,26 mgP/mL para o extrato bruto; 1,96 mgP/mL na fração 0-30%; 2,89 mgP/mL na F 30-60%; e 2,76 mgP/mL em F 60-90%. O perfil proteico foi feito por SDS-PAGE, sendo possível visualizar as

One, Giselle Medeiros da Costa.
O59s Saúde: os desafios do mundo contemporâneo, 3./ Organizadores:
Giselle Medeiros da Costa One; Maria Luisa Souto Porto
1087 fls.

Prefixo editorial: 53005

ISBN: 978-85-53005-08-6 (on-line)

Modelo de acesso: Word Wibe Web

<<http://www.cinasama.com.br>>

Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA – João
Pessoa - PB

1. Farmácia 2. Microbiologia 3. Biotecnologia 4. Genética I.
Giselle Medeiros da Costa One II. Maria Luisa Souto Porto III.
Saúde: os desafios do mundo contemporâneo, 3

CDU: 911

6 CONCLUSÕES

A partir deste trabalho foi possível identificar as principais proteínas presente no soro do leite de cabra e verificar que estas são capazes de inibir o crescimento de micro-organismos com diferentes características, embora haja diferenciações quanto ao percentual de inibição. Além disso, as proteínas do soro do leite caprino também foram capazes de diminuir a proliferação celular de células malignas em aproximadamente 50 %. Esses resultados exibem que as proteínas do soro do leite caprino apresentam ter capacidades nutracêuticas bem como serem utilizadas como um antimicrobiano natural.

A otimização do processo de hidrolise do soro do leite caprino proporcionou um aprimoramento do processamento onde podemos evidenciar qual o parâmetro exerceu maior efeito no grau de hidrolise, melhor perfil peptídico e melhor capacidade antioxidante. Portanto conclui-se que é possível controlar as condições de hidrolise de forma a potencializar a bioprospecção das proteínas do soro caprino.

Dessa forma, os resultados obtidos reafirmam a funcionalidade das proteínas do soro do leite, mostrando que as proteínas do soro caprino podem desempenhar papéis fisiológicos importantes e ainda trazem uma nova perspectiva para utilização destas proteínas para a indústria de alimentos.

ANEXO

09/04/2019
Macromolecules

Gmail - Track your co-authored submission to International Journal of Biological



M. Isabel Campos
<belcampos.va@gmail.com>

Track your co-authored submission to International Journal of Biological Macromolecules

1 mensagem

International Journal of Biological Macromolecules <EviseSupport@elsevier.com>
de abril de 2018 22:58 Responder a: EviseSupport@elsevier.com

7

Para: belcampos.va@gmail.com

Dear Ms Campos,

Submission no: IJBIOMAC_2018_1555

Submission title: ANTIPROLIFERATIVE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY FROM
WHEY PROTEINS OF GOAT MILK

Corresponding author: Dr Tatiane Santi

Listed co-author(s): Miss Paula Barbosa, Miss Laura Camargo, Dr Carlos Gadelha, Dr
LUCIANO Pinto, Ms Maria Campos, Mr José Lopes, Miss Samantha Lima

Dr Santi has submitted a manuscript to International Journal of Biological Macromolecules
and listed you as a co- author. This email is to let you know we will be in contact with
updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system
using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will
then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments
once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/IJBIOMAC?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach01418130%23%2FIJBIOMAC%2Fsubmission%2FIJBIOMAC_2018_1555

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at:

<https://service.elsevier.com> Thank you very much for your submission and we will be in

touch as soon as we have any news to share.

International Journal of Biological Macromolecules

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can
unsubscribe via this link:

<http://www.evise.com/co-author/#/IJBIOMAC/unsubscribe/belcampos.va@gmail.com/amHOMrhTXv4rCslBtaWWOXlkKp7eRa0RhA8gEdRwsO5476EkJQsiF02rgKjoSyhj>

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=3718134470&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1597141366841438956&simpl=msg-f%3A1597141...> 1/1