UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO SORO DO LEITE CAPRINO

JOÃO PESSOA-PB

2023

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO SORO DO LEITE CAPRINO

JOÃO PESSOA-PB

2023

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO SORO DO LEITE CAPRINO

Tese apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos PPGCTA/ UFPB, para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dra. Tatiane Santi Gadelha

JOÃO PESSOA
2023

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C198o Campos, Maria Isabel Ferreira.
Obtenção, caracterização e encapsulação de hidrolisados proteicos do soro do leite caprino / Maria Isabel Ferreira Campos. - João Pessoa, 2023.
173 f. : il.

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

1. Leite caprino. 2. Soro do leite. 3. Hidrolisados proteicos. 4. Peptídeos bioativos. 5. Atividades biológicas. 6. Espectrometria de massas. I. Gadelha, Tatiane Santi. II. Título.

UFPB/BC CDU 613.287.6:636.3(043)

Elaborado por ANNA REGINA DA SILVA RIBEIRO - CRB-15/24

MARIA ISABEL FERREIRA CAMPOS

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO SORO DO LEITE CAPRINO

TESE APRESENTADA EM BANCA DE DEFESA EM 24 de MARÇO de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. TATIANE SANTI GADELHA – DBM/CCEN/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

Prof. Dra. Taliana Kenia Alencar Bezerra - PPGCTA/CT/UFPB
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
FABIO ANDERSON PEREIRA DA SILVA
Data: 27/03/2023 08:20:50-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva - PPGCTA/CT/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dra. Cristiani Viegas Brandão Grisi – PPGTA/UFPB Examinador Externo

Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho UECE
Examinador Externo à Instituição

À minha mãe,
que incentivou meu hábito de leitura,
meus estudos
e todos os meus sonhos
Tudo que sou é por e para você

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Gostaria de antes de tudo agradecer à Deus por proteger aqueles que amo e me abençoar com a graça e o dom de realizar este trabalho. A fé que me rege me fez ter esperança em dias melhores e acreditar que diante de todas as provações haveriam vitórias. “Disse-lhe Jesus: Não te hei dito que, se creres, verás a glória de Deus? ” João 11:40

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA, por todos os conhecimentos adquiridos. À UFPB por ser minha segunda casa durante estes 10 anos desde graduação, mestrado, doutorado e agora como funcionária.

À FAPESQ-CAPEs pela concessão da bolsa durante o período inicial este trabalho, sem esta oportunidade não teria sido capaz de dar continuidade a este sonho. Torço para que a pesquisa seja cada vez mais valorizada no nosso país e que mais alunos tenham a curiosidade e dedicação de serem pesquisadores científicos.

Obrigada também a banca examinadora que vem desde a qualificação contribuindo com este trabalho, como aluna é uma sensação incrível se sentir valorizada pelas suas considerações, ajuda em experimentos e discussões. Professores são a base da nossa estrutura, são mestres, espelhos para os alunos, que e em meio a tantos problemas dedicam uma vida a formar cidadãos.

A minha professora orientadora, Tatiane Santi Gadelha que desde o mestrado compartilha comigo muito mais do que conhecimento, divide experiências, aprendizados para além dos muros do laboratório que nos rodeia. Obrigada pela paciência, pela orientação, mas acima de tudo pela amizade.

A outros professores que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho, seja em discussões, experimentos, conversas, muitas vezes me fazendo enxergar esperança no caminho para obtenção deste título. Aos funcionários que permitiram que esta pesquisa acontecesse.

O doutorado por vezes é um caminho que se percorre sozinho, mas nunca me senti solitária nesse período assim gostaria de citar aqui alguns amigos que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas de infância, Sara, Letícia, Ana Letícia, Agnes e Carol que mesmo com a distância sempre estão ao meu lado sempre em qualquer oportunidade demonstrando seu orgulho com minhas conquistas.

A Yunna, sempre serei grata pelo dia que nos conhecemos, nunca me cansarei de dizer que uma das melhores coisas que já aconteceu na minha vida foi os nossos caminhos terem se

cruzado. Jamais serei capaz de colocar em palavras toda a minha gratidão aos momentos difíceis que você esteve ao meu lado, obrigada por compreender minhas ausências, mas nunca nem por um minuto me fazer esquecer todo o amor que compartilhamos

A José Honório, companheiro de mestrado e doutorado que compartilhou comigo todos os percalços deste caminho, em um ambiente difícil como o da pós-graduação ter encontrado alguém em quem confiar foi de extrema importância para que pudesse chegar ate aqui. Agradeço também aos meus amigos Julia e Kaique que sempre me fizeram eu me sentir realmente especial, obrigada pelos momentos que não cabem neste parágrafo, mas que vão além do lattes.

Agradeço a minha parceira diária de laboratório, Karol, nela eu encontrei uma amizade verdadeira todos os bolos, cafés, roles e conversas diárias, é realmente importante para mim saber que posso sempre contar com você, miga. Todos os dias ainda que os mesmos nunca foram iguais com você comigo, nossa amizade foi ponte, base sólida que em meio a tudo o que passamos nos últimos anos me ergueu, aconselhou, instruiu e acolheu. Além da universidade,

Ao meu esposo, Bruno obrigada pela compreensão, parceria por dividir a vida comigo, acreditar nos meus sonhos e em mim, estar ao meu lado em todos os momentos e sempre tentar fazer com que eu seja feliz. Obrigada por entender todos os momentos que me dediquei a este trabalho ao mesmo tempo me dar todo o apoio necessário e nunca deixando que eu me sentisse só. Essa conquista também é sua. Nossa jornada começou na graduação e hoje temos uma linda história construída com amor, parceria e dedicação.

Obrigada a minha irmã, Maria Antônia, obrigada por ser você do jeitinho que você é. Você é carinho, amor, irmandade. Desde o dia que você chegou na minha vida eu te amo, quero para sempre cuidar e proteger você. Como costumo dizer vamos ser sempre nós acima de tudo.

Em 2020, além de uma pandemia, eu perdi a presença física da minha Mãe, Fatinha. Contudo, em nenhum momento desde sua partida me sinto sem você. Te sinto em todos os momentos, te vejo em todas as situações, escuto sua voz me dizendo para continuar e sei que continua tendo orgulho das minhas conquistas mais simples. Você foi, é e sempre será o amor da minha vida, a pessoa mais importante que já existiu. Conviver 25 anos com você foi um presente que Deus me deu, ser sua filha, sua amiga, muitas vezes sua cuidadora, seu porto seguro fez com que eu me tornasse a mulher que sou hoje. Todas as coisas da minha vida são por você, para você e pensando em você. Te amarei com todas as células do meu corpo até o dia que nos reencontraremos, sou sua cópia sua impressão digital e levarei a todos o seu legado: a sua alegria em viver.

Livros e inteligência?! Há coisas mais importantes, como a amizade e bravura."

Hermione Granger

RESUMO

O subproduto da indústria leiteira gerado em maior volume é o soro do leite, o qual, devido ao progresso das pesquisas vem sendo remodelado de um resíduo da produção de queijos em uma matéria-prima importante na elaboração de novos produtos. Todavia, ainda é frequente que uma parcela seja inapropriadamente descartada, principalmente o soro obtido do leite caprino. Assim é importante desenvolver alternativas de reutilização do soro do leite destacando componentes como as proteínas para a obtenção de moléculas funcionais. Portanto, o presente trabalho propõe o estudo do processo de obtenção a partir de planejamento estatístico, a avaliação do perfil de proteínas e peptídeos, das modificações conformacionais e a análise do potencial biológico de um hidrolisado do soro do leite caprino. Além disso, a fabricação, a análise das características e das propriedades de cápsulas contendo o hidrolisado. O soro de leite ácido foi obtido por precipitação isoelétrica, dialisado, liofilizado e armazenado até a hidrólise. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR 2^2) com configuração estrela e três repetições no ponto central para a hidrólise com pepsina e as amostras foram escolhidas com base no grau de hidrólise. O soro do leite foi avaliado quanto à solubilidade e características físico-químicas e os hidrolisados foram analisados quanto às propriedades tecnológicas, estruturais, funcionais e caracterizados por espectrometria de massas identificando e avaliando os peptídeos por análises de bioinformática. O encapsulamento foi feito por gelificação iônica com alginato de sódio como material de parede e o concentrado proteico do soro como revestimento. As cápsulas foram analisadas quanto à eficiência de encapsulação, características físico-químicas, morfológicas, estruturais e quanto a biodisponibilidade e bioacessibilidade a partir de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. Os resultados mostram que a hidrolise por 150 min foi o tratamento com melhor potencial antioxidante e de liberação de aminoácidos, exibindo frações de menor peso molecular com boa solubilidade e maior hidrólise de beta-lactoglobulina, uma proteína mais resistente. O perfil peptídico mostrou frações bioativas com atividade anti-hipertensiva, antidiabética, antioxidante, e neuropeptídios com efeitos ansiolíticos confirmados pela avaliação do ensaio comportamental utilizando o zebrafish. Ao encapsular estas frações proteicas, obteve-se melhores taxas e eficiência de encapsulação com cápsulas liofilizadas do que com cápsulas úmidas e observou-se que com a adição do revestimento contendo o concentrado proteico houve diminuição da higroscopicidade e da atividade da água e maior atividade antioxidante quando comparado as cápsulas sem revestimento. Este tratamento foi também mais eficaz em aprisionar o hidrolisado durante as condições de digestão gastrointestinal, protegendo a bioatividade e liberando frações bioacessíveis no final da simulação in vitro. Portanto, o encapsulamento foi eficaz para proteger hidrolisados proteicos, o que pode ser útil para melhorar a aplicação destes compostos e promover maiores oportunidades de utilização dos hidrolisados para o desenvolvimento de novas formulações de alimentos funcionais e nutracêuticos. Os resultados obtidos agregam valor à criação de caprinos no semiárido do nordeste brasileiro, fortalecendo a cadeia produtiva do mercado leiteiro e validando a possibilidade de utilização dos hidrolisados como uma estratégia de reutilização do soro do leite de cabra.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos; Bioinformática; Hidrolisados proteicos; Leite caprino; Microencapsulação; Potencial biológico; Proteínas do soro; Soro do leite caprino.

ABSTRACT

The by-product of the dairy industry generated in higher volume is the whey, which due to the progress of research has been refurbished from a residue of cheese production in an important raw material in the development of new products. However, it is still frequent that a portion is inappropriately discarded, especially the whey obtained from goat milk. Thus, it is important to develop alternatives for the reutilization of whey, emphasizing components such as proteins to obtaining functional molecules. Thus, the present work proposes the study of the process of obtaining the whey from statistical design, the evaluation of the profile of proteins and peptides, the conformational modifications and the analysis of the biological potential of a hydrolyzed goat whey. Furthermore, the manufacture, and analysis of the characteristics and properties of capsules containing the hydrolysate. Acid whey was obtained by isoelectric precipitation, dialyzed, lyophilized and stored until hydrolysis. A rotational central composite design (DCCR 2^2) with a star configuration and three repetitions at the center point was performed for hydrolysis with pepsin and the samples were chosen based on the degree of hydrolysis. Whey was evaluated for solubility and physicochemical characteristics and the hydrolysates were analyzed for technological, structural, functional properties and characterized by mass spectrometry identifying and evaluating the peptides by bioinformatics analysis. Encapsulation was done by ionic gelation with sodium alginate as wall material and whey protein concentrate as coating. The capsules were analyzed for encapsulation efficiency, physicochemical, morphological, structural characteristics, and for bioavailability and bioaccessibility from simulated in vitro gastrointestinal digestion. The results show that 150 min hydrolysis was the treatment with the best antioxidant and amino acid release potential, exhibiting lower molecular weight fractions with good solubility and higher hydrolysis of beta-lactoglobulin, a more resistant protein. The peptide profile showed bioactive fractions with antihypertensive, antidiabetic, antioxidant activity, and neuropeptides with anxiolytic effects confirmed by the assessment of the behavioral trial using zebrafish. When encapsulating these protein fractions, better rates and encapsulation efficiency were obtained with lyophilized capsules than with wet capsules and it was observed that with the addition of the coating containing the protein concentrate there was a decrease in hygroscopicity and water activity and higher antioxidant activity when compared to uncoated capsules. This treatment was also more effective in trapping the hydrolysate during gastrointestinal digestion conditions, protecting bioactivity and releasing bioaccessible fractions at the end of the in vitro simulation. Therefore, encapsulation was effective in protecting protein hydrolysates, which may be useful to improve the application of these compounds and promote greater opportunities to use the hydrolysates for the development of new functional food and nutraceutical formulations. The results obtained add value to goat breeding in the semiarid region of northeastern Brazil, strengthening the production chain of the dairy market and validating the possibility of using the hydrolysates as a strategy for reusing goat milk whey.

Keywords: Bioactive peptides; Bioinformatics; Protein hydrolysates; Goat milk; Microencapsulation; Biological potential; Whey proteins; Whey from goat milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho geral metodológico do estudo 44
Figura 2. Rebanho caprino do setor de caprinocultura do campus IV/UFPB 45
Figura 3. Leite (A), fração soro (B) e caseína (C) obtidos após coagulação ácida 47
Figura 4. Fluxograma da hidrólise das proteínas do soro do leite caprino 48
Figura 5. Fluxograma do processo de elaboração das cápsulas contendo o hidrolisado do soro do leite caprino 63

ARTIGO 1

Figura 1. Avaliação do parâmetro tecnológico solubilidade dos hidrolisados do soro do leite caprino 94
Figura 2. Perfil peptídico e proteico por eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina 95
Figura 3. Comportamento da fluorescência intrínseca 96
Figura 4. Caracterização dos hidrolisados da proteína do soro do leite caprino por RP-HPLC 97
Figura 5. Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método ABTS (A) e DPPH (B) 99
Figura 6. Quantidade de peptídeos gerados pela hidrólise com pepsina e proteínas originárias. 100
Figura 7. Distribuição das quantidades de peptídeos por tratamento via diagrama de Venn 100
Figura 8. Espectros de massa carga obtidos por LC-MS de WPH T1(A), WPH T2 (B) e WPH T3 (C) 101
Figura 9. Estrutura química das sequências KALPMHIRL (A): DTDYKKYLL (B) AFNPTQL (C); PMHIRL (D) e DTDYKKYLLF (E) 108
Figura 10. Efeito do peptídeo sob o comportamento locomotor do peixe-zebra adulto no Teste de Campo Aberto (0–5 min). 110
Figura 11. Efeito do hidrolisado na ansiedade do Zfa no teste claro/escuro (0–5 min). (B) Efeito do flumazenil sob o comportamento ansiolítico dos animais tratados com WPH T2 (4, 20 e 40 mg.kg) no teste claro/escuro. 110

Figura 12. (A) Efeito do hidrolisado na convulsão induzida por pentilenotetrazol em peixes-zebra adultos. (B) Efeito do flumazenil (Fmz) na ação anticonvulsivante de WPH T2. 111

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1. (A) Gráfico 3-D e (B) gráfico de contorno da superfície de resposta para o grau de hidrólise em função do tempo e pH dos hidrolisados do soro do leite caprino. 124

Figura 2. Gráfico de Pareto: Influência das variáveis independentes na resposta (GH) 125

Figura 3. Valores estimados e valores preditos no modelo do planejamento estatístico. 125

ARTIGO 2

Figura 1. Elipticidade específica de WPNH (azul) e WPH (vermelho) 146

Figura 2. Distribuição do tamanho das partículas nas amostras de proteína do soro do leite caprino nativa (A) e hidrolisada (B) 147

Figura 3. Curvas de comportamento térmico DSC (A e C) e TG (B e D) de WPNH (azul) e WPH (verde) 149

Figura 4. Capacidade de formação de espuma e avaliação morfológica das bolhas 150

Figura 5. Caracterização da morfologia das partículas 153

Figura 6. Espectros de FTIR das cápsulas e do hidrolisado livre. 158

Figura 7. Difratograma de DRX das cápsulas e do hidrolisado livre 159

Figura 8. Padrão de perda de massa em função da temperatura 160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas dos animais 46

Tabela 2. Níveis reais e codificados dos parâmetros do processo para hidrólise do soro leite de cabra, com a utilização de pepsina como enzima proteolítica 49

Tabela 3. Planejamento experimental do tipo DCCR 2^2 com três repetições no ponto central 49

ARTIGO 1

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. 84

Tabela 2. Planejamento experimental do tipo DCCR 2^2 com três repetições no ponto central 85

Tabela 3. Características dos hidrolisados do soro do leite de cabra em diferentes tempos de hidrólise 93

Tabela 4. Avaliação do score de Bioatividade. 103

Tabela 5. Avaliação da bioatividade de WPH T2 pelo Biopep, valores de A e B 103

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para análise de modelo quadrático de superfície de resposta 125

Tabela 2. Sequencias e características dos peptídeos identificados em WPH T1. 126

Tabela 3. Sequencias e características dos peptídeos identificados em WPH T2 130

Tabela 4. Sequências e características dos peptídeos identificados em WPH T3 133

ARTIGO 2

Tabela 1. Atividade antioxidante do WPH e WPNH pelos métodos de poder de redução total – PRT (densidade ótica), FRAP (µmol Trolox/mg Ptn) e capacidade de eliminação dos radicais ABTS e DPPH (µmol Trolox/mg Ptn). 145

Tabela 2. Caracterização da estrutura secundária do soro do leite de cabra hidrolisado 147

Tabela 3. Raio hidrodinâmico (RH) e polidispersidade (PD) 147

Tabela 4. Teste de eficiência de encapsulação e avaliação da solubilidade do WPH encapsulado 151

Tabela 5. Caracterização do soro do leite hidrolisado encapsulado e cinética de liberação de proteínas das frações digeridas 161

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Perfil de ácidos graxos do leite Caprino em g/100g de lipídios. 26

Quadro 2. Quantitativo de micronutrientes no soro do leite caprino. 27

Quadro 3. Características químicas e físicas das proteínas do soro do leite. 30

Quadro 4 . Produtos comerciais com hidrolisados de proteína do soro do leite ou peptídeos isolados 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

2. REFERENCIAL TEÓRICO 21

3. MATERIAL E MÉTODOS 44

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 44

3.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LEITE E DO SORO 45

3.2.1. Obtenção do leite caprino 45

3.2.2. Produção do soro do leite caprino 46

3.2.3. Caracterização físico-química e proteica do soro do leite caprino 47

3.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 48

3.4. Caracterização dos hidrolisados proteicos do soro do leite caprino 50

3.4.1. Avaliação do grau de hidrólise 50

3.4.2. Determinação de aminoácidos livres 50

3.4.3. Testes de solubilidade 51

3.4.4. Análise de fluorescência intrínseca 51

3.4.5. Perfil de hidrofobicidade 52

3.4.6. Análise da atividade antioxidante *in vitro* 52

3.4.7. Avaliação do perfil peptídico por eletroforese Tris-Tricina 54

3.4.8. Identificação dos peptídeos do hidrolisado proteico por espectrometria de massas LC/MS 54

3.4.10. Análises in sílico 55

3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E TECNOLÓGICA.....56

3.5.1. Espectroscopia de dicroísmo circular – CD 56

3.5.2. Caracterização do tamanho da estrutura proteica 57

3.5.3. Análise termogravimétrica-TG acoplada a calorimetria exploratória diferencial – DSC 58

3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura- MEV 58

3.5.5. Capacidade de formação de espuma 59

3.5.6. Índice de atividade emulsificante 59

3.6. ENSAIO COMPORTAMENTAL *in vivo* COM MODELO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) 60

3.7. MICROENCAPSULAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO.....61

3.7.1. Fabricação das cápsulas contendo o hidrolisado 61

3.7.2 Taxa e eficiência de encapsulação 63

3.7.3. Solubilidade 63

3.7.4. Avaliação de propriedades morfológicas e físico-químicas .....…64

3.7.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR 65

3.7.6. Difração de raios X –DRX 65

3.7.7. Avaliação da digestibilidade gastrointestinal e da bioacessibilidade 65

3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 66

REFERÊNCIAS 68

4. RESULTADOS 67

4.1. ARTIGO 1 80

4.2 ARTIGO 2 137

5. CONCLUSÃO 171

ANEXOS 172

1. INTRODUÇÃO

O mercado global de leite de cabra exibe uma tendência exponencial de crescimento estimando-se que atinja USD 9.232,5 em 2028, com um crescimento anual de 1,02 % em relação ao mercado atual. A Europa, um dos continentes que mais consome leite caprino, produziu 148 milhões de toneladas de leite em 2020, onde cerca de 50% foi direcionado a produção de queijos (BELTRÁN et al., 2023; EUROSTAT, 2020; MARKET UPDATES, 2023).

O Nordeste do Brasil apresenta características propícias para o manejo destes animais, pois o clima semiárido e a vegetação caatinga possibilitam práticas de agropecuária mais econômicas e menos intensas (POLOWSKY, P.; COUDÉ, B.; JIMÉNEZ-MAROTO, L.A.; JOHNSON, M.; PARK, 2017). Logo, a utilização do leite caprino além de valorizar a cultura e tradição regionais também influencia no crescimento do agronegócio voltado a criação de pequenos ruminantes gerando renda para produtores e cooperativas locais (BORBA et al., 2022; LAVELLI; BECCALLI, 2022).

Dentre os produtos caprinos, os queijos tem características sensoriais marcantes e sua popularização expande a perspectiva do aproveitamento do subproduto dessa produção, o soro do leite, um líquido obtido em grandes volumes com nutrientes remanescentes do leite, como vitaminas, minerais, lactose e proteínas (BORBA et al., 2022; LAVELLI; BECCALLI, 2022).

Embora durante anos o soro foi referido como um poluente, sem proveito comercial ou importância nutritiva, esse cenário vem sendo transformado, e atualmente o soro do leite é o subproduto da indústria láctea que apresenta maior prospecção de mercado e potencial de aproveitamento. Novas estratégias vem sendo empregadas para potencializar sua utilização, dentre estas, o uso de enzimas para hidrólise das proteínas presentes do soro do leite vem ganhando notoriedade por ser um processo sustentável, prático, eficaz e seguro (TSERMOULA et al., 2021; ULUG; JAHANDIDEH; WU, 2021).

A hidrólise libera fragmentos proteicos menores da sequência original da proteína que podem desempenhar efeitos tecnológicos e fisiológicos relevantes para inúmeras aplicações na indústria de alimentos e de nutracêuticos (DYBDAHL; SELESKO; MIKKELSEN, 2021; GALLO et al., 2022; LEÓN-LÓPEZ et al., 2022). Além disso os esse processo preserva o valor nutricional das proteínas originais e apresentam vantagens como a menor alergenicidade,

melhor digestibilidade e o maior potencial funcional (DU et al., 2022; LEÓN-LÓPEZ et al., 2022).

Problemas de saúde mental como stress, ansiedade e depressão são circunstâncias presentes em cerca de um 1/3 da população mundial, e estima-se que esse número aumentou ainda mais em decorrência das consequências da pandemia de covid-19. Fármacos utilizados nesses casos clínicos movimentam um mercado milionário e podem apresentar desvantagens aos usuários como efeitos colaterais e dependência. Logo, vem sendo consideradas abordagens terapêuticas naturais, baseadas em evidências, que apresentem menos efeitos colaterais e tenham melhor custo-benefício, como neuropeptídios. Estes podem ser obtidos de hidrolisados proteicos e tem um mecanismo de ação em diferentes sistemas neuroquímicos (SINGEWALD et al., 2023).

Além das ações neurológicas os hidrolisados do soro do leite caprino tem efeitos bioativos múltiplos e são frequentemente associados a mais de uma atividade biológica as quais abrangem, imunomodulatórias, citoprotetivos (FAJARDO-ESPINOZA et al., 2021), antioxidante, antibacteriano (ALIZADEH; ALIAKBARLU, 2020), antiviral (CHAMATA et al., 2021), antifúngico (MUDGIL et al., 2022), hipoglicêmico (inibição da enzima DPP IV) (DU et al., 2022), hipotensores (BABA et al., 2021; KOIRALA; PRATHUMPAI; ANAL, 2021), opióides, probióticos e prébioticos (FENG et al., 2022), e antitumorais (CAMPOS et al., 2022; MEDEIROS et al., 2018).

Apesar da hidrólise enzimática melhorar aspectos diversos, os hidrolisados têm estruturas frágeis que podem ser degradadas no trato gastrointestinal (o que ocasiona a perda da função biológica) e podem apresentar algumas características como higroscopicidade, instabilidade e sabor amargo que podem ser indesejáveis (AGUILAR-TOALÁ et al., 2022; SINGH et al., 2022).

Dessa forma os métodos de encapsulação podem ser uma alternativa à preservação estrutural dos hidrolisados aumentando a estabilidade, condicionando a liberação destes e, portanto, protegendo a bioatividade (HOSSEINI; RAMEZANZADE; MCCLEMENTS, 2021; TOMÉ; DA SILVA, 2022). Nesse processo os componentes são recobertos por uma matriz protetora composta por materiais de preferência biodegradáveis, não tóxicos, de baixo custo e comestíveis (AGUILAR-TOALÁ et al., 2022; RUKLUARH et al., 2019).

Portanto, o objetivo do presente trabalho é otimizar o processo de hidrólise das proteínas do soro do leite caprino, caracterizar e avaliar propriedades funcionais dos hidrolisados utilizando abordagens *in vitro, in sílico* e *in vivo*. Além disso, realizar a encapsulação desse

material e avaliar a biodisponibilidade e bioacessibilidade destes após condições gastrointestinais simuladas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O seguinte artigo de revisão foi publicado em 02/01/2022 v. 11, n. 1 pela revista Research, Society and development. Score Cite Factor: 1.78 (2020-21). Disponível em: https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Artigo de revisão: Propriedades biológicas das proteínas e peptídeos do soro do leite caprino

Review article: Goat whey biology and bioactive properties of proteins and peptides

Artículo de revisión: Propiedades biológicas de las proteínas y péptidos del suero de leche de cabra

Recebido: 03/12/2021 | Revisado: 10/12/2021 | Aceito: 17/12/2021 | Publicado: 02/01/2022

Maria Isabel Ferreira Campos
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1274-2146
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: belcampos.va@gmail.com
Anna Karoline De Sousa Lima
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8008-6745 Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: karol_slima@hotmail.com
José Honório Pereira Lopes Neto
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0002-8324 Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: netoea22@gmail.com
Julia Mariano Caju de Oliveira
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9388-5108 Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: juliacaju0@gmail.com
Tatiane Santi Gadelha
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9451-9820
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: santi.tatiane@gmail.com

Resumo

O leite caprino é utilizado há décadas em substituição aos demais leites por estar associado a melhor digestibilidade, menor alergenicidade e potenciais benefícios à saúde do consumidor. A indústria láctea ocasionalmente descarta subprodutos como o soro do leite de cabra, um líquido amarelado, que pode ser obtido pela fabricação de queijos ou pela precipitação ácida das caseínas. O soro é a fração solúvel do leite que contém diversos componentes remanescentes notoriamente interessantes, como as proteínas, presentes na forma de um pool proteico, que tem potencial de apresentar diferentes atividades biológicas, bem como, propriedades tecnológicas de grande interesse. A hidrólise das proteínas do soro do leite caprino demonstra ser um processamento eficaz para obtenção de moléculas bioativas que devido a sua funcionalidade tem grande potencial para serem microencapsuladas. Assim essa revisão da literatura de maneira geral compila apenas estudos envolvendo o leite caprino, e faz um apanhado a respeito da composição do leite caprino e o desenvolvimento da caprinocultura leiteira. Bem como busca enfatizar as proteínas e peptídeos do soro do leite caprino e as bioatividades a quais estas são relacionadas, de maneira a gerar um maior entendimento sobre suas características tecnológicas, atividades biológicas e funcionais possibilitando reunir conhecimentos de uma fonte proteica com diversos benefícios a saúde que geralmente é descartada, e pode ser melhor aproveitado pela indústria, proporcionando geração de renda para aqueles que sobrevivem desta atividade agropecuária.

Palavras-chave: Proteínas do soro; Componentes funcionais caprinos; Peptídeos bioativos.

Abstract

Goat milk has been used for decades as a substitute for other milks because it is associated with better digestibility, lower allergenicity and potential health benefits to the consumer. The dairy industry occasionally discards by-products such as goat milk whey, a yellowish liquid that can be obtained by cheesemaking or by acid precipitation of caseins. Whey is the soluble fraction of milk that contains several notoriously interesting remaining components, such as proteins, present in the form of a protein pool, which have the potential to exhibit different biological activities as well as technological properties of great interest. The hydrolysis of goat whey proteins has proven to be an effective process to obtain bioactive molecules that due to their functionality have great potential to be microencapsulated. Thus, this literature review compiles only studies involving goat milk, and summarizes the composition of goat milk and the development of goat dairy farming. As well as seeks to emphasize the proteins and peptides of goat milk whey and the bioactivities to which they are related, in order to generate a greater understanding of their technological characteristics, biological and functional activities enabling gathering knowledge of a protein source with several health benefits that is usually discarded, and can be better used by the industry, providing income generation for those who survive this agricultural activity.

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Keywords: Whey proteins; Goat functional compounds; Caprine bioactive peptides.

Resumen

La leche de cabra se ha utilizado durante décadas como sustituto de otras leches porque se asocia a una mejor digestibilidad, menor alergenicidad y posibles beneficios para la salud del consumidor. La industria láctea desecha ocasionalmente subproductos como el suero de leche de cabra, un líquido amarillento, que puede obtenerse mediante la fabricación de quesos o la precipitación ácida de las caseínas. El suero es la fracción soluble de la leche que contiene varios componentes remanentes notoriamente interesantes, como las proteínas, presentes en forma de pool proteico, que tienen el potencial de presentar diferentes actividades biológicas, así como propiedades tecnológicas de gran interés. La hidrólisis de las proteínas del suero de la leche de cabra demuestra ser un proceso eficiente para obtener moléculas bioactivas que por su funcionalidad tienen un gran potencial para ser microencapsuladas. Así pues, esta revisión bibliográfica recopila únicamente estudios generales sobre la leche de cabra, y hace un repaso de la composición de la leche de cabra y del desarrollo de la ganadería lechera. Además de tratar de destacar las proteínas y péptidos del suero de la leche de cabra y las bioactividades con las que se relacionan, con el fin de generar un mayor conocimiento de sus características tecnológicas, actividades biológicas y funcionales permitiendo reunir el conocimiento de una fuente de proteína con varios beneficios para la salud que normalmente se descarta, y que puede ser mejor aprovechada por la industria, proporcionando la generación de ingresos para los que sobreviven a esta actividad agrícola.

Palabras clave: Proteínas del suero; Componentes funcionales de la cabra; Péptidos bioactivos.

1. Introdução

Alimentos funcionais são aqueles que além do seu elevado valor nutricional são capazes de desempenhar funções benéficas na fisiologia do organismo devido à funcionalidade associada a sua composição. Dentre os diversos tipos de alimentos funcionais, as proteínas e os peptídeos derivados de fontes alimentares vêm ganhando destaque nas pesquisas cientificas devido aos diferentes tipos de atividades biológicas ao qual estão relacionados, incluindo atividades antioxidantes, anti-hipertensivas, antitumorais, antibacterianas e imunomodulatórios (Contreras et al., 2011).

Peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite tem atraído grande interesse no campo dos alimentos funcionais por serem obtidos através de uma matéria prima de baixo custo e de fácil obtenção, não demonstrando toxicidade e exibirem diferentes atividades biológicas atribuídas a sua potencial habilidade de modulação de rotas metabólicas exercendo um efeito geral benéfico para a fisiologia do indivíduo (Yadav et al., 2015).

A região Nordeste do Brasil possui o maior rebanho caprino por apresentar características propícias para criação destes animais, tais como o clima semiárido e a vegetação caatinga. O leite caprino é responsável por 13,5 % da produção mundial, porém apesar dos benefícios, da relevância e do alto valor nutricional ainda há obstáculos para o aproveitamento e valorização do soro caprino, que muitas vezes é descartado pelas indústrias e cooperativas causando sérios problemas ao meio ambiente e a população. Ademais, as características biológicas e nutricionais do soro do leite caprino, a presença de compostos com propriedades funcionais e a capacidade tecnológica para o desenvolvimento de novos produtos projeta um novo cenário experimental voltado à utilização desta matriz (Lopes et al., 2012; Pulina et al., 2018).

O soro do leite de cabra é um subproduto de fácil obtenção que possui um alto valor nutricional, biológico e uma composição proteica variada e multifuncional com capacidade de ser inserida em contextos biológicos, tecnológicos e nutricionais (Lopes et al., 2012).

A obtenção de peptídeos bioativos (PBA's) a partir das proteínas do soro do leite por hidrólise a partir de proteases tem se mostrado um processamento eficaz para obtenção de bioativos, contudo estes hidrolisados enfrentam obstáculos para serem comercializados, tais como a alta higroscopicidade, hidrofobicidade, o sabor amargo, a instabilidade, a ocorrência de reações com a matriz alimentar e muitas a digestão completa perdendo assim a sua funcionalidade (Batista et al., 2018). Assim uma das possíveis formas de aumentar a utilização dos

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

hidrolisados é utilizando a tecnologia de encapsulação dos que auxilia no enfrentamento das limitações acima mencionadas, tornando os hidrolisados do soro do leite de cabra um material de alto valor biológico para a indústria de alimentos com aplicações na produção de alimentos funcionais (Yadav et al., 2015).

A crescente busca por alimentos que possuem características benéficas à saúde, e contribuam para uma melhor qualidade de vida, prevenindo ou auxiliando no tratamento de doenças, conduz à necessidade de exploração da biofuncionalidade dos alimentos. Esta mudança no perfil de consumo, associada à necessidade de expansão e sustentabilidade da cadeia produtiva do leite caprino, valida os esforços para o estudo aprofundado de características químicas diferenciais naturalmente presentes, assim como para a avaliação de fatores que possam influenciá-las, visando agregar valor ao soro do leite fortalecendo a economia e a competitividade no mercado de laticínios.

Com base nisso, esta revisão de literatura objetiva realizar um apanhado de trabalhos científicos voltados a valorização das proteínas do soro do leite caprino além de delinear aspectos como a composição do leite caprino e o cenário da produção de leite, buscando reunir informações que possam elucidar melhor o entendimento a respeito dos potenciais funcionalidades do soro do leite e assim prospectar o desenvolvimento de novas pesquisas e contribuir para a agregação de valor deste subproduto.

2. Metodologia

Neste estudo foi realizada uma revisão da literatura com base em uma extensa pesquisa bibliográfica em confiáveis bases de dados científicos com Science Direct, Scopus, Wiley Online Library e Scientific Electronic Library Online (Scielo). Para a busca dos artigos científicos foram utilizados os seguintes descritores: “whey protein goat milk”, “goat milk composition”, “caprine milk”, “sérum goat”, “funcnionality whey protein”, “goat milk bioactive”. Assim foram selecionados artigos preferencialmente em língua inglesa e escolhidas as publicações datadas entre os anos de 2011 a 2021 para elaboração de uma revisão focada na composição do leite caprino, nas proteínas do soro do leite caprino e na possível aplicação de seus peptídeos funcionais.

3. Resultados e Discussão

3.1 Resultados e Discussão

3.1.1 Caprinocultura Leiteira

Leites de animais não tradicionais representam cerca de 17 % do total da produção a nível mundial, cerca de 133 milhões de toneladas por ano. Dentre estes animais, as cabras (Capra aegagrus hircus) são responsáveis pela produção de uma quantidade de 12,2 milhões de toneladas métricas de leite sendo produzidas por um rebanho caprino estimado de aproximadamente 780 milhões. Números estes que são uma aproximação do valor real, levando em consideração que a produção de cabras é bastante difundida em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, que não tem informações estatísticas bem registradas para agricultura e pecuária deste setor (Turkmen, 2017; Ranadheera et al., 2019)

A caprinocultura é a atividade agropecuária relacionada à criação de cabras, tanto em ambiente doméstico como por sistemas de produção mais elaborados. As principais raças de cabras criadas para produção do leite são Toggenburg, Saanen, Alpina, sendo a primeira a maior produtora de litros de leite produzidos por dia, aproximadamente 7,5 L/dia (G et al., 2016). No Brasil, em 2020, houve um aumento no rebanho caprino em comparação com 2018 e 2019, batendo a marca de 12 milhões de cabeças de cabra (IBGE, 2020). Sendo na região nordeste o maior contingente de rebanho bem como o maior núcleo produtor de leite, fato esse provavelmente

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

relacionado à capacidade destes ruminantes se adaptarem melhor ao clima semiárido e a vegetação caatinga (Brasil. Ministério da Agricultura, 2000)

A região nordeste é a região que apresenta a maior produção de leite caprino no Brasil, onde os Estados da Paraíba, Ceará e Pernambuco se organizam em uma cadeia produtiva voltada ao desenvolvimento local de cooperativas e associações de pequenos produtores que se inserem no contexto de produção, beneficiamento e comercialização do leite e de produtos a partir do leite caprino, como queijos, iogurtes, bebidas lácteas e etc. (Silanikove et al., 2010).

O manejo do rebanho por parte dos criadores se adequa aos sistemas de produção agropecuária destes ruminantes para melhor exploração da atividade leiteira seguindo um fluxo de cadeia produtiva que vai desde o fornecimento de insumos, passando pela cadeia de produtores e criadores que acompanha a dinâmica de unidades de processamento e transformação da matéria prima (carne, leite ou lã) seguindo assim para distribuição desses produtos para um consumidor final (Monteiro et al., 2021). 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 (Silanikove et al., 2010; Lopes et al., 2012; Monteiro et al., 2021).

Contudo os produtores enfrentam dificuldades técnicas, econômicas e sociais sofrendo as consequências do desamparo das políticas públicas que possam impulsionar a comercialização, e assim ocasionem o desenvolvimento de uma legislação específica que prospecte a divulgação de produtos caprinos e seus benefícios, passando a tratar esta cadeia produtiva como um negócio em potencial e não apenas como uma atividade de subsistência.

Sendo assim, mais estudos que evidenciem os benefícios do consumo do leite caprino, que proporcionem ideias inovadoras na elaboração de produtos derivados deste leite, agregam valor a essa categoria do agronegócio e voltam à atenção do comércio e da indústria para este setor comercial potencializando sua a inserção no mercado e impulsionando a cadeia produtiva da criação de pequenos ruminantes estimulando assim não só a permanência do homem no campo como possibilitando que esta seja digna e promissora.

3.1.2 Composição do Leite Caprino

A composição do leite de cabra é o principal fator que tem levado a maior visibilidade deste tipo de leite, o perfil de ácidos graxos, as proteínas presentes, os menores tamanhos dos glóbulos de gordura, a ausência de aglutinina e a menor quantidade de αs1-caseina são propriedades que favorecem a digestibilidade.

O leite caprino apresenta uma coloração branca puro, com odor e sabor diferenciados, devido à presença de ácidos graxos de cadeia curta e média (6–16 carbonos) como os ácidos capróico, caprílico e cáprico onde estes por sua vez são diretamente usados como fonte de energia por serem menores, não se depositando no tecido adiposo e apresentarem potenciais bioatividades como a capacidade de prevenir a resistência à insulina, a esteatose e a inflamação hepática evidenciadas em um modelo animal (Clark & Mora García, 2017; Delgadillo-Puga et al., 2020).

O perfil de ácidos graxos presentes no leite caprino foi resumido no quadro 1, onde pode ser visualizada a presença do ácido linoleico conjugado (CLA) que se relaciona a diversos efeitos benéficos como a redução do estresse oxidativo, a participação nas reações de inflamação, na síntese de mediadores inflamatórios como os eicosanoides e ácidos araquidônicos, e por desempenhar um importante papel protetivo no sistema nervoso e cardiovascular (Salari et al., 2016; Gumus & Gharibzahedi, 2021; Mollica et al., 2021)

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Quadro 1. Perfil de ácidos graxos do leite Caprino em g/100g de lipídios.

Butírico (C4:0)	**2.18**
Capróico (C6:0)	2.39
Caprílico (C8:0)	2.73
Cáprico (C10:0)	9.97
Láurico (C12:0)	4.99
Mirístico (C14:0)	9.81
Miristoleico (C14:1)	0.18
Palmítico (C16:0)	28.00
Palmitoleico (C16:1)	1.59
Esteárico (C18:0)	8.88
Oleico (C18:1)	19.3
Linoleico (C18:2)	3.19
Linolênico (C18:3)	0.42
inoleico conjugado(C18:2)	0.70
Pentadecanóico(C15:0)	0.71

Fonte: Amigo e Fontecha (2011); Watkins et al. (2021).

As proteínas do leite caprino são divididas em dois grandes grupos: as caseínas e as proteínas solúveis ou proteínas do soro do leite. As caseínas são proteínas fosforiladas (nos resíduos seril e, em menor frequência, em resíduos treonil) de estrutura aberta e flexível, e se apresentam na forma de micelas, um agregado supramolecular dinâmico que apresenta partículas porosas, com elevado nível de hidratação que são mantidos juntos pela ação de interações intermoleculares (não covalentes) (Jones et al., 2012; Holt, 2016; Verruck et al., 2019a).

As micelas de caseína são subdivididas em subunidades κ-, β-, αs1-, αs2-, e γ-caseínas. Para o leite caprino as caseínas representam cerca de 70% do total proteico, chegando a quantidades em torno de 4g/100 mL (Dalgleish, 2011) A fosforilação presente nas micelas de caseína é responsável pela manutenção da estrutura micelar e pela maior afinidade por cátions bivalentes, como cálcio e magnésio, dessa forma as transformações que venham a ocorrer nessa estrutura por alterações físico-químicas do meio (pH, temperatura, força iônica, enzimas) é o que pressupõe a aptidão tecnológica do leite para transformação em derivados lácteos (Dalgleish, 2011; Al-Saadi et al., 2014; N. N. Silva et al., 2019).

Uma das principais características que leva à substituição do leite bovino pelo leite caprino é a menor alergenicidade de suas proteínas devido a polimorfismos genéticos espécie-dependentes. As principais proteínas relacionadas ao desenvolvimento de alergias são a α-S1-caseína e a β-caseína (Schulmeister et al., 2009; Amalfitano et al., 2020). Para a fração α-s1 da caseína, o leite caprino apresenta maior quantidade da fração α-S2 do que da α-S1 (em comparação ao leite bovino e humano) podendo assim ser uma alternativa para indivíduos que apresentem o desenvolvimento de desordens relacionadas ao consumo do leite bovino (Park et al., 2017)

Outra possível relação é a existência de um genótipo expressado no leite bovino na fração β-caseína, a qual apresenta duas formas A1 e A2, que diferem entre si devido a substituição na posição 67 do aminoácido histidina (A1) para prolina (A2). A fração A1 da β-caseína quando passa pela digestão gastrointestinal libera um peptídeo chamado β-casomorfina-7 (BCM-7) que parece ser o fator primário para o desenvolvimento de problemas digestivos relacionados ao consumo de leite bovino (Park & Haenlein, 2021).

A lactose é o principal carboidrato presente no leite caprino e está presente em quantidade semelhante as do leite bovino e de camelo, porém em menor concentração do que no leite humano e de ovelha. Ao contrário dos

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

outros macronutrientes é possível perceber que sua quantidade no leite caprino sofre modificações crescentes conforme avança o período de lactação, podendo chegar até cerca de 5% (Soliman, 2005; Kljajevic et al., 2018). Outros carboidratos presentes no leite caprino são os nucleotídeos, os oligossacarídeos e aqueles conjugados com frações proteicas tais como as glicoproteínas e os glicopeptídeos (Giorgio et al., 2018; Verruck et al., 2019b)

Diversos processos tecnológicos são aplicados baseados em modificações na lactose, Queiroz et al. (2021) realizarama hidrolise enzimática da lactose para obtenção de um leite caprino em pó sem lactose, voltado para consumidores que possuem restrições no consumo deste açúcar. O processo mais comum é à fermentação da lactose para produção de diferentes tipos de produtos, a exemplo da bebida probiótica fermentada com teor reduzido de lactose desenvolvida por Pawlos (2020), do sorvete caprino probiótico formulado por Silva et al., (2015) do kefir e do iogurte probiótico elaborado por Azizkhani et al., (2021).

Com relação aos micronutrientes o quadro 2 resume o quantitativo de minerais e vitaminas presentes no leite caprino, que apresenta uma quantidade mais elevada do que o leite de vaca (chegando a um total de 0,85%) Conforme descrito no quadro 2, o ferro e cobre estão presentes em menores quantidades porém, estes possuem melhor bioacessibilidade dos que aqueles provenientes de outros tipos de leite, impactando na maneira com a qual o organismo poderá utiliza-los para os processos digestivos e metabólicos (Ceballos et al., 2009; Amigo & Fontecha, 2011; Verruck et al., 2019ª; Mehra, et al., 2021) No que diz respeito à composição de vitaminas, a vitamina A se destaca por apresentar um papel importante nas respostas imunológicas inatas e adaptativas. (Park, 2006; Chauhan et al., 2021).

Quadro 2. Quantitativo de micronutrientes no soro do leite caprino.

Vitaminas	**Leite Caprino**
Vit A(UI)	185
Vit D (UI)	2.3
Vitamina B1 (mg)	0.048
Vitamina B2 (mg)	0.138
Vitamina B3 (mg)	0.277
Vitamina B5 (mg)	0.31
Vitamina B6 (mg)	0.046
Vitamina C(mg)	1.29
VitaminA B9 (μg)	1.00
VitaminA B7 (μg)	1.5
VitaminA B12 (μg)	0.065
Minerais (mg)	**Leite Caprino**
Cálcio	134
Fósforos	121
Magnésio	16
Potássio	204
Sódio	41
Iodo	0.022
Enxofre	28

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Ferro	0.05
Cobre	0.05
Manganês	0.032
Zinco	0.30

A constituição básica do leite caprino pode ser afetada por diversos fatores, em estudo realizado por Bolacali e Küçük, (2012) sobre as características do leite produzido por cabras Saanen, os fatores genéticos: raça e espécie; ambientais: clima e solo; práticas de caprinocultura, sistemas confinado, pasto e misto foram determinantes para alterar a composição. Costa et al., (2021) observaram também a interferência da qualidade do consumo hídrico na qualidade e composição do leite caprino.

Sabendo que a dieta dos animais é um fator que pode alterar a qualidade do leite, diversos estudos reportam as possíveis alterações geradas pela modificação na qualidade da alimentação e observam que mudanças na composição das rações podem ocasionar mudanças no perfil volátil, lipídico, proteico, na estabilidade oxidativa do próprio leite e no desempenho de atividades funcionais como o potencial antioxidante (Razzaghi et al., 2015; Ianni et al., 2021; Mavrommatis & Tsiplakou, 2020; Mitsiopoulou et al., 2021; Nascimento et al., 2021; Tajaddini et al., 2021). Tais estudos prospectam a otimização da cadeia produtiva do leite, e possibilitam o estudo de modificações que podem melhorar as características d economia leiteira aumentando a utilização do leite caprino e difundindo seus benefícios funcionais (Hammam et al., 2021).

As propriedades físicas e químicas do leite caprino estão bem elucidadas por diversos trabalhos (Haenlein & Wendorff, 2006; Park, 2006), ainda assim estudos recentes buscam observar a consequência de aplicação de diferentes processamentos nas características do leite caprino, como cor, ponto de congelamento, densidade, acidez, pH e na composição centesimal. Razali et al., (2021) observaram o efeito da aplicação da alta pressão em substituição a pasteurização do leite caprino e concluíram que a aplicação de uma pressão menor que 400 MPa / 5 min, reduz a contagem de placas a valores indetectáveis e possibilita menores alterações de viscosidade, sólidos solúveis totais, pH e cor total prolongando a estabilidade durante a vida de prateleira.

Dessa forma, a aplicação de processamentos no leite embora desejável do ponto de vista industrial, comercial e econômico, devem ser bem estudadas para otimizar as condições e características de modo a atender a demanda comercial/industrial bem como a manutenção das características nutricionais e sensoriais.

Em um estudo recente vários tipos de processamentos foram avaliados no leite de cabra: a aplicação de calor, o desnate, a concentração a vácuo e a microfiltração e como estes alteram as propriedades físico-químicas como estabilidade ao calor, cor, atributos reológicos e alterações nos componentes bioativos. Diante disso, os autores verificaram que todas as intervenções tiveram efeito significativo sobre o teor de gordura, proteína e cinzas, o aquecimento e concentração levaram a diminuição do pH enquanto que o desnate foi o que menos afetou os componentes bioativos. O tratamento térmico causou adiamento da gelificação do coalho e formou um coágulo menos resistente. Do ponto de vista microbiológico, o leite de cabra microfiltrado reduziu as contagens de bactérias e coliformes totais (Saipriya et al., 2021).

3.1.3 Soro do leite, caracterização e aplicações tecnológicas de suas proteínas

Apesar da produção do soro do leite pela produção de queijos ser o processo mais popular, existem outros tipos de obtenção, dentre elas: a coagulação enzimática, processo empregado na produção de queijos, que consiste na adição de uma enzima, que ocasiona a precipitação das caseínas e separação do soro; a precipitação ácida

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

quando o pH baixa até atingir o ponto isoelétrico da caseína, ocasionando a insolubilidade e coagulação, se separando da fração solúvel o soro; e a separação física das micelas de caseína por microfiltração, baseado na diferença de tamanho das caseínas em comparação com as proteínas do soro (Smithers, 2008; Yadav et al., 2015).

Independentemente do processo, irá ocorrer à formação de um concentrado de micelas caseínicas (precipitado) e do soro do leite (sobrenadante), um liquido amarelado devido a presença de riboflavina. A produção enzimática do soro resulta em um subproduto conhecido como "soro doce", devido a coagulação ocorrer em torno de pH 6,5 próximos a neutralidade. A obtenção por abaixamento do pH produz o "soro ácido", pois é obtida em pH em torno de 4.6-5.0, após a precipitação o volume de soro obtido representa cerca de 80% do volume inicial do leite e esse volume muitas vezes é descartado pelas indústrias ocasionando a poluição de solos e águas (Sgarbieri, 2004; Kosseva et al., 2009).

Dessa forma, fatores como o elevado valor nutricional do soro do leite, a capacidade funcional, tecnológica que possibilita aplicações industriais juntamente com as prospecções científicas indicam que este subproduto pode contribuir de forma benéfica para a fisiologia do corpo e manutenção da saúde, despertando um caminho conjunto entre o interesse científico e o envolvimento comercial das indústrias de laticínios no soro do leite (J et al., 2015).

A composição do soro do leite de cabra pode ser afetada de acordo com o tipo de processamento do leite, da raça dos animais e de fatores genéticos, mas de um modo geral apresenta 93-94% de água e nutrientes remanescentes do leite como a lactose, proteínas solúveis, minerais, ácidos orgânicos, baixo teor de gordura e 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 (Panesar et al., 2013; Saipriya et al., 2021).

Blanca Hernández-Ledesma et al., 2011 relata que a composição do soro do leite, proveniente de ovinos e caprinos, apresenta particularidades no que diz respeito à capacidade do soro destas espécies em 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". Além disso, as proteínas do soro do leite vêm sendo descritas como melhores fontes proteicas que outros tipos de proteínas como caseína, proteínas do ovo, da soja, de carnes reforçando assim a qualidade nutricional dessas na dieta da população (Mangano et al., 2019).

Dentre os constituintes do soro do leite, as proteínas vêm ganhando cada vez mais notoriedade devido às atividades biológicas as quais são capazes de desempenhar e com isso podem ser utilizadas para formulação de diversos produtos com propriedades benéficas à saúde. Além disso, as proteínas do soro também apresentam potencial tecnológico para a indústria de alimentos (capacidade emulsificante, espumante, geleificante) devido as suas excelentes propriedades funcionais correlacionadas às suas características físicas, químicas e estruturais (Pescuma et al., 2010).

As proteínas do soro do leite caprino em sua maioria são sintetizadas na glândula mamária do animal e sua composição proteica quantitativa indica ser uma mistura heterogênea de diferentes proteínas individuais, onde cada uma apresenta diferenciação nas propriedades funcional, fisiológica e nutracêuticas (Yadav et al., 2015). Estas são divididas em dois diferentes grupos: as proteínas majoritárias, que inclui a β-lactoglobulina (β-Lg), a proteína de maior concentração no soro, seguida pela lactoalbumina (α-La); e as proteínas minoritárias que incluem as Imunoglobulinas, sérum albuminas, o sistema lactoperoxidase, proteases e peptonas, lisozima,

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

lactoferrina e eventualmente, macro peptídeos de caseína (Hernández- Ledesma, 2011). O quadro 3 resume as características químicas e físicas de cada proteína anteriormente mencionada.

Além do perfil proteico, o soro do leite possui todos os aminoácidos essenciais (na quantidade recomendada ou acima), tais como fenilalanina e tirosina e elevadas concentrações de triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (Sgarbieri, 2004).

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

Proteína	Ponto Isoelétrico	Peso Molecular (kDa)	Quantidade de aminoácidos	Quantidade (%)
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

Fonte: Autores (2012).

Apesar dos benefícios, da relevância tecnológica e do alto valor nutricional há limitações na utilização in natura do soro do leite devido a sua alta atividade de água acarretando em significativa perecibilidade, elevada diluição dos seus componentes e seu elevado teor de lactose ocasiona uma demanda biológica e química de oxigênio bastante acentuada (Kareb & Aïder, 2019). Contudo para evitar à perda do produto e da qualidade nutricional, a indústria de alimentos utiliza técnicas de processamento como a evaporação, spray-drying, liofilização, separação por membranas (ultrafiltração, microfiltração e diafiltração) que geram produtos como o concentrado do soro do leite (ainda há a presença de outros componentes do soro como lactose e gordura, contudo a maior parte da água foi retirada), a proteína isolada de soro do leite (proteína na sua forma mais pura), a lactose isolada e outras frações (Brans et al., 2004; Mollea et al., 2013; Batista et al., 2018).

Processos biotecnológicos são frequentemente empregados no soro, onde este é utilizado como substrato de micro- organismos e enzimas para obtenção de produtos finais com elevado valor biológico, nutricional e tecnológico (Kosseva et al., 2009; Sousa et al., 2012; Panesar et al., 2013). Um exemplo é a proteína hidrolisada do soro do leite que é comercializada visando uma rápida digestão e absorção das proteínas e aminoácidos. (Sousa et al., 2012; Kanda et al., 2013).

Correlações entre o desempenho funcional das proteínas em suas estruturas nativas são pontuais na literatura uma vez que a bioatividade tem sido frequentemente relacionada a obtenção de peptídeos bioativos (PBA's) a partir das proteínas do soro do leite. Peptídeos bioativos podem ser definidos como fragmentos proteicos específicos, que contém cerca de 2 a 20 resíduos de aminoácidos, e proporcionam desejáveis efeitos positivos no funcionamento corporal influenciando na promoção da saúde (Minj & Anand, 2020). Outra definição traz que os peptídeos apresentam atividade similar a uma droga ou hormônio, que eventualmente modulam uma função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo, levando a indução de respostas fisiológicas (Haque & Chand, 2008).

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Estas pequenas sequências de aminoácidos quando presentes na proteína nativa não são capazes de desempenhar funcionalidade necessitando assim serem liberados na forma de peptídeos por reações de quebra das ligações peptídicas da proteína original. 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 proteases vegetais ou microbianas (Korhonen & Pihlanto, 2006)

Diversos efeitos funcionais dos PBA's de hidrolisados da proteína do soro têm sido descritos na literatura tais como efeitos antioxidantes, antiproliferativos e antibacterianos, imunomoduladores, antidiabéticos, anticolesterolêmicos, efeitos benéficos na microbiota intestinal, efeitos no sistema nervoso como inibidores e estimulantes opióides (Mann et al., 2019; Mehra et al., 2020; Kumar, et al., 2021)

3.2 Atividades funcionais do soro do leite

A seguir serão discutidas as atividades funcionais mais relevantes das proteínas do soro do leite caprino e seus peptídeos.

3.2.1 Atividade de inibição da ECA

A enzima conversora de angiotensina (ECA) atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) e no sistema de óxido nítrico quinina (KNOS), agindo como um potente vasoconstrictor e consequentemente aumentando a pressão arterial. Dessa forma, moléculas capazes de inativar esta enzima podem regularizar a pressão arterial e ajudar a manter o funcionamento do sistema cardiovascular (Ibrahim et al., 2017; Xia et al., 2020).

Proteínas e peptídeos naturalmente presentes, ou obtidos pela hidrólise do leite caprino vem sendo reportados por desempenharem até 67% de inibição da ECA (Koirala et al., 2021). Quando submetidas a hidrólise com pepsina, as proteínas do soro do leite demonstraram maiores teores de inibição da ECA do que quando comparadas as proteínas nativas, sendo possível identificar um peptídeo do soro proveniente de β-lactoglobulina (no fragmento PEQSLACQCL, resíduo 113-122) com potente inibição da ECA (Ibrahim et al., 2017). O tamanho dos peptídeos e sua carga residual demonstra ser um fator interferente na inibição da ECA, como observado por Moreno-Montoro et al., (2017) peptídeos menores e com cargas não básicas demonstraram melhores valores de inibição e também melhores resultados de atividade antioxidante.

A fermentação por bactérias ácido láticas (BAL) também ocasiona a produção de peptídeos bioativos, podendo ser empregadas na produção de derivados do leite caprino com propriedades funcionais, como queijos, iogurtes dentre outros (Rubak et al., 2021; Y. Xia et al., 2020)

3.2.2 Atividade antibacteriana

O pool proteico do soro do leite vem sendo relacionado a inibição do crescimento de micro-organismos oferecendo assim um sistema protetivo naturalmente presente que age contra bactérias patogênicas. As proteínas lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase e as imunoglobulinas, bem como de peptídeos obtidos a partir das proteínas do soro do leite caprino vem sendo relatados serem potencialmente antimicrobianos (Mann et al., 2019; Soloshenko et al., 2020).

Sabendo que o soro do leite caprino apresenta uma composição variada de proteínas Medeiros et al., (2018) testaram o potencial bacteriostático frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas *(Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) das proteínas intactas e de suas frações, observando assim uma sinergia entre proteínas e peptídeos na obtenção melhores resultados quando comparados as suas formas isoladas.

Peptídeos antibacterianos possuem algumas características especiais: são geralmente menores que 10 kDa, o que possibilita sua entrada na célula bacteriana; possuem aminoácidos de caráter hidrofóbico; apresentam

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

carga residual catiônica que favorece seletivamente interações eletrostáticas das estruturas α-hélice e folhas-β com as membranas aniônicas das bactérias. Todos estes aspectos favorecem a permeabilidade dos peptídeos para o interior das bactérias ocasionando a lise e morte celular (Almaas et al., 2011; Esmaeilpour et al., 2017).

Dessa forma a obtenção de peptídeos pela hidrolise do soro do leite caprino demonstra ser uma importante ferramenta para obtenção de peptídeos com potencial antibacteriano, uma vez que para diferentes cepas microbianas foi observada melhor inibição do crescimento quando o soro do leite hidrolisado foi testado em comparação ao não hidrolisado, exibindo melhores potenciais de inibição para as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (Lestari & Suyata, 2019). As proteínas majoritárias β-lactoglobulina e α-lactoalbumina possuem a sequência de aminoácidos Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr que tem sido caracterizada por possuir atividade antimicrobiana, logo a hidrólise destas proteínas pela Alcalase® possibilitou a liberação de dois peptídeos antimicrobianos (Osman et al., 2016).

3.2.3 Atividade Antifúngica

Os fungos toxigênicos são contaminantes bastante presentes nos alimentos que prejudicam o armazenamento e a vida de prateleira de vários tipos de gêneros alimentícios trazendo problemas à segurança alimentar, causando perdas econômicas e sendo um risco em potencial a saúde pública. Estes tipos de fungos possuem a capacidade de produzir toxinas potencialmente cancerígenas que vão se acumulando no organismo e podem levar a consequências agudas e crônicas perigosas. A Ochratoxina A, por exemplo, é um metabólito secundário produzido pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* que apresentam danos aos rins, toxicidade ao sistema imune, inibição da síntese macromolecular, aumenta a peroxidação lipídica e inibe a respiração mitocondrial (Adeyeye, 2016; Bui-Klimke & Wu, 2015; Luz et al., 2020).

Sabendo da capacidade do leite caprino em demonstrar um efeito antimicrobiano, estudos envolvendo atividades antibacterianas e antivirais são bem descritos na literatura, contudo, propriedades antifúngicas destas proteínas vêm sendo recentemente avaliadas. Luz et al., (2020) obteve hidrolisados proteicos do soro do leite e avaliou atividade antifúngica (contra *Penicillium* spp.), caracterizou os peptídeos obtidos e os incorporou na formulação de pão pita como um bioconservante. Este estudo observou que houve inibição por parte das proteínas do soro do leite caprino não só dos fungos como na produção de micotoxinas, onde 27 peptídeos antibacterianos puderam ser caracterizados e influenciaram positivamente na vida e prateleira dos pães.

Propriedades antifúngicas das proteínas do soro do leite caprino também foram observadas quando o soro foi fermentado por diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum*, os autores testaram 28 cepas dos fungos *Aspergillus, Penicillium* e *Fusarium* por 72 horas de incubação, onde observaram que a escolha da cepa foi crucial para o desenvolvimento da inibição e os gêneros com melhores valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram *Fusarium genus* e *Aspergillus steynii*, chegando a 1.95 g/L, ressaltando assim o uso de bactérias ácido láticas em proteínas pra promover a capacidade antifúngica do soro do leite de cabra (Izzo et al., 2020).

3.2.4 Atividade Antiviral

Dentre as doenças virais a Covid-19 trouxe consequências em várias esferas do cotidiano tendo implicações médicas, científicas, biológicas, sociais, econômicas, políticas, culturais e históricas. Assim, surgiu uma necessidade de realizar aprofundamento, de forma rápida, nos conhecimentos relacionados à prevenção, obtenção de vacinas e no tratamento, que pudessem frear o avanço da doença e as mortes ao redor do mundo.

A potencialização da doença Covid-19 está relacionada a alguns fatores como a furina (uma serina endopeptidase) que facilita a transmissão do vírus ao clivar os sítios de ligação S1 deixando o sítio S2 expostos, e duas proteínas que funcionam como receptores do vírus na célula hospedeira a DPP-4/CD26 (uma proteina

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

transmembrana do tipo II) e a enzima conversora de angiotensina-ECA (Coutard et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Vankadari & Wilce, 2020).

A estrutura do SARS-CoV-2 inclui as proteínas *Spikes*, associadas à capacidade de entrada do patógeno nas células humanas, o domínio de ligação ao receptor S1 e o domínio S2, que medeia a integração do vírus na célula hospedeira parecem ser as 3 principais formas de propagação da replicação do vírus (Coutard et al., 2020; Kong et al., 2020; S. Xia et al., 2020).

Dessa forma moléculas que possam impedir a ligação do sitio ativo do vírus e inibir a replicação tem ganhado notoriedade, onde estudos *in sílico* vem sendo desenvolvidos baseados na inibição das proteínas furina, DPP-4 e ECA. Sabendo que os peptídeos derivados do soro do leite podem inibir a ECA, Çakır et al., (2021) hidrolisou o soro do leite caprino com tripsina e sequenciou os peptídeos obtidos, observando assim a partir de técnicas de bioinformática e *docking* molecular que seis peptídeos derivados da beta-lactoglobulina podem inibir a ECA, a DPP-4 e a enzima sérica furina, onde dois potenciais peptídeos (ALMPHIR e IPAVFK) podem ser candidatos promissores em estudos in vitro e in vivo no tratamento da síndrome respiratória causada pelo SARS-CoV-2.

3.2.5 Atividade antioxidante e imunomodulatória

No que diz respeito a capacidade antioxidante dos peptídeos do soro de leite e o mecanismo de ação destes fragmentos proteicos tem sido relatado estar relacionado a mecanismos de "*radical scavenger*" ou seja, inativação das espécies reativas do oxigênio, bloqueio dos radicais livres, agindo assim na inibição da cadeia reacionária da oxidação. Outro mecanismo de ação diz respeito à quelação dos peptídeos com íons metálicos, é ainda relatado a possibilidade de ocorrer à combinação dos dois mecanismos de ação a depender do peptídeo (Zhou et al., 2012).

Os peptídeos antioxidantes geralmente têm maior número de grupos ionizáveis, para que possam desencadear as reações de oxirredução, com maior exposição de grupos hidrofóbicos em sua molécula, apresentando frequentemente cadeias com resíduos de 5-11 aminoácidos. A forma como esses peptídeos realizam a inibição da oxidação vai depender da sequência dos aminoácidos destas moléculas (Sarmadi & Ismail, 2010; Zhou et al., 2012).

Entre as metodologias mais utilizadas, estão àquelas baseadas na capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) utilizando o radical ABTS e DPPH, e para avaliar a quelação com íons metálicos é comum a utilização do teste de poder antioxidante de redução de íons férricos (FRAP) e o método ORAC que mede a inibição baseado no radical peroxil e na transferência de átomos de hidrogênio (Alves et al., 2010). Koirala et al., (2021) observou que os hidrolisados da proteína do soro do leite caprino têm a capacidade antioxidante aumentada quando tratados por ultrassonicação. Provavelmente o potencial antioxidante destas proteínas está relacionado aos aminoácidos metionina e cisteína, presentes nas proteínas β-Lactoglobulina, α-Lactoalbumina, BSA e a lactoferrina (Meng et al., 2021).

A capacidade antioxidante frequentemente está relacionada com efeitos imunomodulatórios, onde foi observado que a administração da proteína do soro do leite de cabra em ratos idosos influenciou em menores concentrações de malonaldeído (MDA), e maiores concentrações da enzima superóxido dismutase (SOD). Além disso, efeitos a nível imunológico foram observados, tais como a estimulação de imunoglobulina G (IgG), menores concentrações de citocinas inflamatórias como as interleucinas -2 e 6 (IL-2 e IL 6) e o aumento do peso do timo (órgão relacionado a função imunológica) (Z. Ma et al., 2021).

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Peptídeos bioativos habitualmente podem apresentar propriedades multifuncionais, por exemplo, a maioria dos peptídeos que são capazes de desempenhar atividade antioxidante também pode inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), modular respostas imunológicas (B. Hernández-Ledesma et al., 2008).

3.2.6 Atividade antiproliferativa e antitumoral

Devido ao aumento expressivo na incidência de casos de câncer no mundo, as pesquisas têm buscado encontrar moléculas que sejam capazes de agir de modo a diminuir a proliferação de células cancerígenas. Há um crescente interesse em investigar metabólitos naturais que modulem biomarcadores de células cancerígenas, onde as proteínas e peptídeos vêm demonstrando o seu potencial nutracêutico em atuar nos diferentes estágios do câncer, incluindo iniciação, promoção e progressão (De Mejia & Dia, 2010; Sung et al., 2021).

Dessa forma a proteína do soro de leite tem sido estudada por apresentar uma potencial atividade antitumoral/antiproliferativa que tem sido respaldada com evidências científicas como a quantidade significativamente alta dos aminoácidos cistina e cisteína e de dipeptídeos γ-glutamilcisteína, que são substratos eficientes para a síntese de glutationa. (Brandelli et al., 2015).

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

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 μg / mL do soro caprino.

Dentre as proteínas do soro do leite, a lactoferrina tem sido o enfoque das pesquisas pois resultados promissores atrelados a funcionalidade desta proteína mostram a sua capacidade de inibir tumores intestinais e possivelmente outros tumores (De Mejia & Dia, 2010). Acredita-se que o potencial de ação se dê pela atividade do peptídeo lactoferricina (LFcin), derivado da lactoferrina, que atua de diversas maneiras: por indução de apoptose, modulação de enzimas metabolizadoras de carcinogênicos, bloqueando o ciclo celular, modificando a expressão gênica e prevenindo a angiogênese (Gifford et al., 2005)

Estudos in vitro apontam que a LFcin 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 e não prejudica linfócitos normais, fibroblastos, células endoteliais ou epiteliais (Furlong et al., 2010).

A propriedade seletiva na ação da LFcin parece ser devido ao seu caráter fortemente catiônico, possibilitando assim a interação com em células cancerígenas carregadas negativamente, resultando na desestabilização das membranas celulares. O não prejuízo à membrana celular de células saudáveis se dá devido a carga liquida neutra destas, mantendo-as poupadas (De Mejia & Dia, 2010).

3.2.7 Influência no microbioma intestinal

A microbiota intestinal é dita como um "órgão" dinâmico e metabólico que exerce diversas funções a nível local e influencia na resposta nutricional, no ciclo circadiano, no metabolismo e na imunidade (Tilg et al., 2020). Logo, a dieta em conjunto com outros fatores pode interferir na composição do microbioma, portanto as proteínas do soro caprino podem ser uma opção eficaz para ocasionar benefícios na microbiota do intestino, onde peptídeos probióticos podem promover o bem- estar ao influenciar no potencial de redução-oxidação e equilíbrio entre as bactérias intestinais (Lynch & Pedersen, 2016; Araújo et al., 2017).

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Proteínas do soro do leite caprino quando usadas como suplementos para ratas e filhotes desempenharam um efeito positivo na composição da microbiota fecal, na morfologia intestinal, na redução induzida no ganho de peso e gordura visceral demonstrando assim aptidão destas proteínas em desempenhar efeitos no microbioma (Costa Paulino et al., 2019). Outro estudo evidencia a modulação intestinal do leite caprino em diferentes fases de maturação, onde foi observado o aumento da quantidade de bactérias presentes no intestino, tais como *Lactobacillus, Muribaculum* e *Alistipes*, podendo este ser uma importante fonte de probióticos (Liu et al., 2021).

A modulação intestinal está intrinsicamente relacionada com alterações em marcadores imunomodulatórios e de inflamação, podendo ser evidenciado pela ação do leite caprino e das proteínas em estudos que envolvem modelos animais com colite, onde observaram uma melhora significativa de diversos parâmetros inflamatórios como a atividade da mieloperoxidase, regulação negativa da expressão gênica de vários marcadores pró-inflamatórios, como IL-1β, IL-6, IL-17, TNF-α, iNOS, MMP-9, ICAM-1, inibição das vias de sinalização de NF-κB p65 e p38 MAPK, redução do malonaldeído e aumento da glutationa, assim como na manutenção da citoarquitetura colônica e na diminuição da expressão da ciclooxigenase-2 e da óxido nítrico sintase induzível além de aumentar a expressão de proteínas como mucinas, proteínas de ocludina (Assis et al., 2016; Araújo et al., 2017).

3.2.8 Hidrolisados da proteína do soro do leite

Embora as proteínas do soro do leite sofram ataque por enzimas durante a digestão no trato gastrointestinal, esta não é suficiente para garantir um possível efeito fisiológico decorrentes da sua catálise, uma vez que as proteínas podem ser totalmente digeridas liberando os aminoácidos livres para absorção no intestino, dessa forma realizar a hidrolise destas proteínas em escala laboral se tornou um trabalho proveitoso e útil para a produção de peptídeos bioativos.

Assim, em uma escala industrial ou laboratorial, podem ser utilizadas uma enzima ou combinações entre duas ou mais enzimas para a reação, a depender da necessidade do processamento. Outra característica favorável da aplicação da hidrólise nas proteínas do soro do leite é a possibilidade de aperfeiçoar algumas características que podem vir a interferir na velocidade e na efetividade da reação, tais com: a adequação do pH da solução contendo o substrato, o tempo de reação, a temperatura aplicada e a relação entre a concentração de enzima e substrato. Naik et al., (2013) observaram que a razão enzima/substrato e o pH foram os fatores de maior influência no grau de hidrólise de proteínas do soro hidrolisadas por tripsina.

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, ou enzimas de origem animal, por exemplo, as que participam da digestão no trato gastrointestinal: tripsina, pepsina (Zhang et al., 2013).

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 hidrolise são parâmetros fundamentais na obtenção de um perfil peptídico adequado, e que a hidrolise 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) avaliaram a atividade antibacteriana de peptídeos obtidos quando o soro do leite isolado foi hidrolisado por tripsina e quimiotripsina. Os resultados mostram que os peptídeos derivados de β- Lactoglobulina foram capazes de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* mas não demonstraram atividades frente a diferentes cepas de Escherichia coli.

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Lacroix e Li-Chan, (2013) hidrolisaram as proteínas isoladas do soro do leite utilizando pepsina para verificar se os peptídeos inibiam a ação da enzima dipeptidil peptidase (DPP-IV) e α-glicosidase. Todos os hidrolisados demonstraram serem capazes de inibir a DPP-IV, sendo o hidrolisado de alfa-Lactoalbumina o que demonstrou melhor potencial. Com relação à inibição da α-glicosidase os hidrolisados das proteínas majoritárias demonstraram atividade, sugerindo assim que os peptídeos gerados podem regular a glicemia.

A utilização comercial dos hidrolisados da proteína do soro é ainda emergente, mas já tem sido empregada para formulação de produtos funcionais, utilizando estes como enriquecimento de produtos ou de forma individual, como pode ser observado no quadro 4. Embora haja potencial para utilização dos peptídeos bioativos como ingrediente alimentar muito ainda falta ser pesquisado de modo a obter processos de produção economicamente rentáveis, e assim acelerar o desenvolvimento de produtos funcionais a partir destes hidrolisados.

Quadro 4 . Produtos comerciais com hidrolisados de proteína do soro do leite ou peptídeos isolados.

Produto	Fabricante	Tipo de produto	Proteína/Peptídeo	Alegação de saúde
BioZate® product line	Davisco, USA	Isolado da proteína do soro do leite hidrolisada	Fragmentos de β-lactoglobulina	Redução da pressão arterial
BioPureGMP™			GMP f (106–169)	Prevenção de cáries, modulação da coagulação sanguínea, antibacteriano, antiviral.
Vivinal® ALPHA	Borculo Domo Ingredients (BDI), the Netherlands	Hidrolisado da proteína do soro do leite como ingrediente	Peptídeo derivado do soro do leite	Relaxamento e sonolência
Praventin™	DMV International, the Netherlands	Cápsula de suplemento alimentar	Lactoferrina	Redução da acne
Dermylex™	Advitec, Inc., Canada	Tablete de suplemento alimentar	Extrato do soro do leite XP- 828L	Redução dos sintomas de Psoríase
Hilmar™8390	Hilmar Ingredients, USA	Suplemento alimentar	Proteína do soro do leite hidrolisada	Inibição das enzimas ACE e DPP-IV
NOP-47™	Glanbia Nutritionals, USA	Suplemento alimentar e farmacêutico	Peptídeo derivado do soro do leite	Propriedades anti- inflamatórias

Fonte: Ballard et al., (2009); Korhonen, (2009); Lacroix et al., (20160.

Após a obtenção dos hidrolisados, diversas técnicas de proteômicas, metabolômica e possível interatoma podem ser empregadas de modo a identificar os peptídeos, e a partir de sua sequência correlaciona-los com sua possível funcionalidade. Assim métodos *in silico* utilizando ferramentas de bioinformática e aliados aos testes in vivo podem ser aplicados para possibilitar a confirmação da alegação de saúde destas moléculas, para tanto são utilizadas técnicas cromatográficas, métodos de separação por membranas, sequenciamento para identificação dos peptídeos e por fim isolamento com confirmação da sua bioatividade para que dessa forma sejam utilizados para formulação de produtos (Agyei et al., 2016).

Jia et al., (2021) fizeram a análise proteômica do soro do leite caprino e bovino em dois períodos de lactação, o colostro e o soro do leite maduro, constatando que as proteínas e a atividade biológica variam por animal ou por período de lactação. Foram identificadas 487 proteínas sendo estas, 290 no soro caprino colostro e

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

240 no Soro caprino maduro, 57 proteínas expressas no soro caprino foram identificadas “de forma inédita". Através de análises de bioinformática utilizando as proteínas identificadas por espectrometria de massas, observaram que o soro caprino possui proteínas relacionadas a hipoglicemia, catabolismo de lipídios, resposta imunológica, processo metabólico do ATP, ossificação, diminuição da pressão arterial e de atividade molecular estrutural.

Ainda assim, devido à sensibilidade das características das proteínas, os tratamentos aplicados tanto antes, durante e depois da hidrólise devem ser empregados de modo cauteloso, controlados de modo a não provocar alterações que possam levar a perda da funcionalidade (Dullius et al., 2018). Diante das alternativas para utilização dos PBA’S em escala industrial dois fatores devem ser sempre levados em consideração, sendo estes a bioestabilidade e a biodisponibilidade dos peptídeos, pois a manutenção dessas características é essencial para obter efeitos fisiológicos e os peptídeos precisam estar intactos ao atingirem os seus alvos e possam assim exercer sua bioatividade (Mohan et al., 2015).

Nem sempre as pesquisas que envolvem hidrolisados de proteínas avaliam a bioestabilidade e biodisponibilidade dos peptídeos, embora fortes evidências cientificas indiquem que a bioatividade in vitro nem sempre é replicada em modelos animais e em seres humanos (Mohan et al., 2015). Dessa forma as técnicas de encapsulação de bioativos surgem como uma alternativa que proporcionem a manutenção da estrutura do peptídeo intacta durante a digestão gastrointestinal e assim controle a sua liberação fisiológica, resguardando a atividade funcional do peptídeo (Udenigwe, 2014).

3.2.9 Utilização dos hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos por microencapsulação

A encapsulação é um processo industrial utilizado para o acondicionamento de um material específico (núcleo) em cápsulas que podem ser formuladas a partir de uma variedade de materiais, que liberam os compostos ativos do núcleo em intervalos específicos e variados a depender da cápsula (Champagne & Fustier, 2007).

Esta tecnologia se tornou relevante para a utilização de bioativos pela indústria alimentar uma vez que possibilita driblar diferentes obstáculos que estão presentes quando se busca aplicar a utilização de moléculas bioativas, principalmente de hidrolisados proteicos, tais como: higroscopicidade dos hidrolisados, hidrofobicidade, sabor amargo e suscetibilidade a degradação total pela digestão no trato gastrointestinal (Fathi et al., 2014; Mohan et al., 2015).

Contudo, para a aplicação da encapsulação é necessário estabelecer e avaliar a influência de fatores relacionados à produção das cápsulas, incluindo o tipo de sistema carreador, o método usado para encapsulação, a pureza e o tipo do material de parede, a relação entre núcleo-parede e as condições de encapsulação. De forma a estabelecer as melhores características que possam culminar em maiores eficiências de encapsulação (Mohan et al., 2015).

A indústria de alimentos opta por selecionar a utilização de materiais de parede que sejam comestíveis, biodegradáveis, não apresente toxicidade e tenham baixo custo. Diante disso a utilização de proteínas, polissacarídeos, lipídios ou a combinação de mais de um tipo de material para a elaboração do material envoltório tem ganhado notoriedade das pesquisas (Fathi et al., 2012; Tavares et al., 2014).

A utilização de proteínas como material de parede ocorre devido as suas características funcionais como elevada solubilidade, formação de um gel firme, capacidade emulsionante, e assim quando combinadas a polissacarídeos tendem a formar cápsulas com maior estabilidade estrutural. Dentre os tipos de proteínas que podem ser utilizadas como materiais de parede estão as proteínas dos derivados de soja, e as proteínas do leite

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

como as caseínas e as proteínas do soro do leite, na sua forma concentrada ou isoladas (Sáiz-Abajo et al., 2013; Mohan et al., 2015).

As proteínas do soro do leite como material de parede vêm sendo descrita por diversos estudos, principalmente utilizando estas proteínas na microencapsulação de probióticos. Doherty et al., (2012) observou maior sobrevivência da cepa Lactobacillus rhamnosus GG ao trato gastrointestinal quando encapsulada em microcápsulas contendo proteínas do soro isoladas e traz a perspectiva de que proteínas do soro do leite podem serem matrizes de retenção eficazes.

Em outro estudo López-Rubio & Lagaron, (2012) avaliaram a capacidade das proteínas do soro do leite na formação de cápsulas, microcápsulas e nanocápsulas por tecnologia de eletropulverização, para encapsulação de β-caroteno. Estes autores sugerem que o uso das proteínas do soro do leite concentradas como matriz encapsulante ainda é pouco explorado, embora tenha um grande potencial devido às excelentes características funcionais destas proteinas e seu baixo custo de obtenção.

O'Neill et al., (2014) formulou dois tipos de cápsulas contendo riboflavina como núcleo e proteínas do soro do leite concentradas como material de parede a partir de um processo de gelificação a frio e avaliou a eficiência de encapsulação deste bioativo, obtendo maiores quantidades de riboflavina quando as cápsulas feitas de proteínas do soro do leite foram utilizadas como solvente no momento da encapsulação.

No que diz respeito da utilização tanto de hidrolisados proteicos como de peptídeos bioativos do soro do leite como núcleo da encapsulação, diversos estudos têm reportado a potencial eficácia da utilização desta tecnologia embora ainda sejam necessárias mais pesquisas que explorem a encapsulação desta matriz.

Um estudo desenvolvido por Sarabandi et al., (2018) avaliou a microencapsulação de hidrolisados de caseína, as propriedades micro estruturais das cápsulas como teor de umidade, atividade de água, densidade de derivação, solubilidade e higroscopicidade, estrutura química, microestrutura, sabor amargo e atividades antioxidantes. Os autores utilizaram maltodextrina como material de parede e obtiveram as cápsulas por spray-dryer. Os resultados obtidos demonstram maiores atividades antioxidantes dos hidrolisados que foram microencapsulados, menor higroscopicidade destes e assim os autores sugerem que essa é uma tecnologia eficaz para a utilização de hidrolisados da proteína do leite.

Gómez-Mascaraque et al., (2016) elaboraram microcápsulas de quitosana e gelatina por spray-drying para encapsulação de um hidrolisado da proteína do soro do leite potencialmente bioativo, e observaram a estabilidade das cápsulas após a digestão gastrointestinal e a estabilidade dos peptídios quando adicionados a iogurtes (resistência a fermentação ácido- lática). Os resultados demonstraram que a maior eficiência de encapsulação foi observada para as cápsulas de quitosana, e não houve alterações no perfil peptídico do hidrolisado digerido.

Outro estudo avaliou a diferença da obtenção de microcápsulas elaboradas a partir de soro do leite concentrado e alginato de sódio por spray-drying e freeze-drying na atividade imunomodulatório, sabor amargo e higroscopicidade de hidrolisados da proteína do soro do leite. Os resultados obtidos indicam que a utilização do spray-drying foi melhor capaz de reduzir o sabor amargo e higroscopicidade sem prejudicar a atividade imunorreguladora do hidrolisado protéico do soro do leite (J.-J. Ma et al., 2014).

Diante da potencial bioatividade dos hidrolisados do soro do leite, são necessários estudos que explorem além da alegação da atividade biológica outras propriedades como a biodisponibilidade, bioestabilidade e assim busquem impulsionar a utilização destas moléculas de forma viável e em uma escala prática para que possam exercer benefício à saúde da população.

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

4. Conclusão

A partir do desenvolvimento deste trabalho de revisão, conclui-se que o leite caprino é uma fonte de componentes funcionais de grande importância nutricional e biológica, onde as proteínas do soro ganham destaque devido a sua diversidade, potencial tecnológico e capacidade de desempenhar efeitos biológicos. Por se tratar de um subproduto barato, obtido em grandes quantidades, o soro do leite desperta um interesse científico expressivo e pertinente, onde trabalhos como este funcionam como instrumento para a prospecção da cadeia produtiva do leite caprino e contribui para a disseminação de informações acerca das proteínas do soro do leite de cabra e suas possíveis aplicações práticas baseadas no seu potencial funcional.

Referências

Adeyeye, S. A. O. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127

Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides.

Food and Bioproducts Processing, 98, 244–256. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003

Al-Saadi, J. S., Shaker, K. A., & Ustunol, Z. (2014). Effect of heat and transglutaminase on solubility of goat milk protein-based films. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 420–426. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12138

Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm, H., Jensen, E., Jacobsen, M., Langsrud, T., & Vegarud, G. E. (2011). Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *British Journal of Nutrition*, 106(6), 896–905. https://doi.org/10.1017/S0007114511001085

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202–2210. https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033

Amalfitano, N., Stocco, G., Maurmayr, A., Pegolo, S., Cecchinato, A., & Bittante, G. (2020). Quantitative and qualitative detailed milk protein profiles of 6 cattle breeds: Sources of variation and contribution of protein genetic variants. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11190–11208. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18497

Amigo, L., & Fontecha, J. (2011). *Milk | Goat Milk. In Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 484–493). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407- 4.00313-7

Araújo, D. F. S., Guerra, G. C. B., Pintado, M. M. E., Sousa, Y. R. F., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Araújo, R. F., Gálvez, J., Queiroga, R. de C. R. E., & Rodriguez-Cabezas, M. E. (2017). Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice. *PLOS ONE*, 12(9), e0185382. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185382

Aslam, H., Marx, W., Rocks, T., Loughman, A., Chandrasekaran, V., Ruusunen, A., Dawson, S. L., West, M., Mullarkey, E., Pasco, J. A., & Jacka, F. N. (2020). The effects of dairy and dairy derivatives on the gut microbiota: a systematic literature review. *Gut Microbes*, 12(1), 1799533. https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1799533

Assis, P. O. A. de, Guerra, G. C. B., Araújo, D. F. de S., Araújo Júnior, R. F. de, Machado, T. A. D. G., Araújo, A. A. de, Lima, T. A. S. de, Garcia, H. E. M., & Queiroga, R. de C. R. do E. (2016). Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yoghurt in the acetic acid model of rat colitis. *International Dairy Journal*, 56, 45–54. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.002

Attaallah, W., Yılmaz, A. M., Erdoğan, N., Yalçın, A. S., & Aktan, A. Ö. (2012). Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. *Pathology and Oncology Research*, 18(4), 817–822. https://doi.org/10.1007/s12253- 012-9509-9

Azizkhani, M., Saris, P. E. J., & Baniasadi, M. (2021). An in-vitro assessment of antifungal and antibacterial activity of cow, camel, ewe, and goat milk kefir and probiotic yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 406–415. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00645-4

Ballard, K. D., Bruno, R. S., Seip, R. L., Quann, E. E., Volk, B. M., Freidenreich, D. J., Kawiecki, D. M., Kupchak, B. R., Chung, M.-Y., Kraemer, W. J., & Volek, J. S. (2009). Acute ingestion of a novel whey-derived peptide improves vascular endothelial responses in healthy individuals: a randomized, placebo controlled trial. *Nutrition Journal*, 8(1), 34. https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-34

Batista, M. A., Campos, N. C. A., & Silvestre, M. P. C. (2018). Whey and protein derivatives: Applications in food products development, technological properties and functional effects on child health. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1509687. https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1509687

Bolacali, M., & Küçük, M. (2012). Fertility and Milk Production Characteristics of Saanen Goats Raised in Muş Region. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.4895

Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149–161. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016

Brans, G., Schroën, C. G. P. H., Van Der Sman, R. G. M., & Boom, R. M. (2004). Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*, 243(1–2), 263–272. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.06.029

BRASIL. Ministério da Agricultura, P. e A. (2000). 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).

Bui-Klimke, T. R., & Wu, F. (2015). Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13), 1860–1869. https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724480

Çakır, B., Okuyan, B., Şener, G., & Tunali-Akbay, T. (2021). Investigation of beta-lactoglobulin derived bioactive peptides against SARS-CoV-2 (COVID- 19): In silico analysis. *European Journal of Pharmacology*, 891, 173781. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173781

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., & Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 322–329. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.020

Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184–190. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001

Chauhan, S., Powar, P., & Mehra, R. (2021). A review on nutritional advantages and nutraceutical properties of cow and goat milk. *International Journal of Applied Research*, 7(10), 101–105. https://doi.org/10.22271/allresearch.2021.v7.i10b.9025

Clark, S., & Mora García, M. B. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10026–10044. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287

Contreras, M. del M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 9–15. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.017

Costa Paulino, B., de Souza Aquino, J., Leite de Souza, E., Alencar de Sousa Gomes, J., Paulo Lins, P., Alcoforado Sena de Lima, T., Maria dos Santos Alves, E., & do Nascimento, E. (2019). Goat Milk Whey Improves Nutritional Status, Fecal Microbial Composition and Intestinal Morphology in Female Rats Fed a Westernized Diet and Their Offspring. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(4), 291–302. https://doi.org/10.12691/jfnr-7-4-6

Costa, R. G., Freire, R. M. B., de Araújo, G. G. L., Queiroga, R. de C. R. do E., Paiva, G. N., Ribeiro, N. L., Oliveira, R. L., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2021). *Effect of Increased Salt Water Intake on the Production and Composition of Dairy Goat Milk. Animals*, 11(9), 2642. https://doi.org/10.3390/ani11092642

Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*, 176, 104742. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742

Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, 7(6), 2265–2272. https://doi.org/10.1039/C0SM00806K

De Mejia, E. G., & Dia, V. P. (2010). The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), 511–528. https://doi.org/10.1007/s10555-010-9241-4

Delgadillo-Puga, C., Noriega, L. G., Morales-Romero, A. M., Nieto-Camacho, A., Granados-Portillo, O., Rodríguez-López, L. A., Alemán, G., Furuzawa- Carballeda, J., Tovar, A. R., Cisneros-Zevallos, L., & Torre-Villalvazo, I. (2020). Goat's Milk Intake Prevents Obesity, Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Fed A High-Fat Diet by Reducing Inflammatory Markers and Increasing Energy Expenditure and Mitochondrial Content in Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5530. https://doi.org/10.3390/ijms21155530

Demers-Mathieu, V., Gauthier, S. F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., & Jean, J. (2013). Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28(2), 94–101. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.09.003

Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Brodkorb, A. (2012). Survival of entrapped Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. *International Dairy Journal*, 22(1), 31–43. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.009

Dullius, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58–74. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.12.063

Esmaeilpour, M., Ehsani, M. R., Aminlari, M., Hoseini, E., & Azad, I. (2017). Antimicrobial peptides de rived from goat's milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 65–72.

Fathi, M., Martín, Á., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18–39. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007

Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13–27. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003

Furlong, S. J., Mader, J. S., & Hoskin, D. W. (2010). 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*, 88(3), 371–375. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.02.001

G, G., A, M., A, W., & H, K. (2016). Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 3(4). https://doi.org/10.15744/2393-9060.3.401

Gifford, J. L., Hunter, H. N., & Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2588–2598. https://doi.org/10.1007/s00018- 005-5373-z

Giorgio, D., Di Trana, A., & Claps, S. (2018). Oligosaccharides, polyamines and sphingolipids in ruminant milk. *Small Ruminant Research*, 160, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.006

Gómez-Mascaraque, L. G., Miralles, B., Recio, I., & López-Rubio, A. (2016). Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. *Journal of Functional Foods*, 26, 290–300. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.006

Gumus, C. E., & Gharibzahedi, S. M. T. (2021). Yogurts supplemented with lipid emulsions rich in omega-3 fatty acids: New insights into the fortification, microencapsulation, quality properties, and health-promoting effects. Trends in *Food Science & Technology*, 110, 267–279. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.016

Haenlein, G. F. W., & Wendorff, W. L. (2006). Sheep Milk. In Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals (pp. 137–194). Blackwell Publishing Professional. https://doi.org/10.1002/9780470999738.ch7

Hammam, A. R. A., Salman, S. M., Elfaruk, M. S., & Alsaleem, K. A. (2021). *Goat Milk: Compositional, Technological, Nutritional, and Therapeutic* Aspects. https://doi.org/10.20944/PREPRINTS202108.0097.V1

Haque, E., & Chand, R. (2008). Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 227(1), 7–15. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0689-6

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., & Amigo, L. (2008). β-Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35(2), 257–265. https://doi.org/10.1007/s00726-007-0585-1

Hernández-Ledesma, Blanca, Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. Á. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101(1–3), 196–204. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell, 181(2), 271-280.e8. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Holt, C. (2016). Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *International Dairy Journal*, 60, 2–13. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.004

Ianni, A., Innosa, D., Oliva, E., Bennato, F., Grotta, L., Saletti, M. A., Pomilio, F., Sergi, M., & Martino, G. (2021). Effect of olive leaves feeding on phenolic composition and lipolytic volatile profile in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8835–8845. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20211

IBGE. (2020). *Pesquisa da Pecuária Municipal* 2020.

Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63–71. https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.002

Izzo, L., Luz, C., Ritieni, A., Quiles Beses, J., Mañes, J., & Meca, G. (2020). Inhibitory effect of sweet whey fermented by Lactobacillus plantarum strains against fungal growth: A potential application as an antifungal agent. *Journal of Food Science*, 85(11), 3920–3926. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15487

J, D.-C., F, L., M, M., MJM, A., MS, C., & I, L.-A. (2015). Influence of Goat Milk on Iron Deficiency Anemia Recovery. *International Journal of Dairy Science & Processing*, 7–11. https://doi.org/10.19070/2379-1578-150003

Jia, W., Zhang, R., Zhu, Z., & Shi, L. (2021). LC-Q-Orbitrap HRMS-based proteomics reveals potential nutritional function of goat whey fraction. *Journal of Functional Foods*, 82, 104502. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104502

Jones, R. G., Ober, C. K., Hodge, P., Kratochvíl, P., Moad, G., & Vert, M. (2012). Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry*, 85(2), 463–492. https://doi.org/10.1351/PAC-REC-12-03-12

Kanda, A., Nakayama, K., Fukasawa, T., Koga, J., Kanegae, M., Kawanaka, K., & Higuchi, M. (2013). Post-exercise whey protein hydrolysate supplementation induces a greater increase in muscle protein synthesis than its constituent amino acid content. *British Journal of Nutrition*, 110(6), 981–987. https://doi.org/10.1017/S0007114512006174

Kareb, O., & Aïder, M. (2019). Whey and Its Derivatives for Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Functional Foods: a Critical Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 348–369. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9427-6

Kljajevic, N. V., Tomasevic, I. B., Miloradovic, Z. N., Nedeljkovic, A., Miocinovic, J. B., & Jovanovic, S. T. (2018). Seasonal variations of Saanen goat milk composition and the impact of climatic conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 299–303. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2938-4

Koirala, S., Prathumpai, W., & Anal, A. K. (2021). Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. *International Dairy Journal*, 118, 105026. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105026

Kong, R., Yang, G., Xue, R., Liu, M., Wang, F., Hu, J., Guo, X., & Chang, S. (2020). COVID-19 Docking Server: a meta server for docking small molecules, peptides and antibodies against potential targets of COVID-19. B*ioinformatics*, 36(20), 5109–5111. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa645

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. J*ournal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012

Kosseva, M. R., Panesar, P. S., Kaur, G., & Kennedy, J. F. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5), 437–447. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005

Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2013). Inhibition of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV and α-Glucosidase Activities by Pepsin-Treated Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7500–7506. https://doi.org/10.1021/jf401000s

Lacroix, I. M. E., Meng, G., Cheung, I. W. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2016). Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? Journal of Functional Foods, 21, 87–96. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.038

Lestari, P., & Suyata. (2019). Antibacterial activity of hydrolysate protein from Etawa goat milk hydrolysed by crude extract bromelain. IOP Conference

Series: Materials Science and Engineering, 509, 012111. https://doi.org/10.1088/1757-899X/509/1/012111

Liu, Y., Cai, J., & Zhang, F. (2021). Influence of goat colostrum and mature milk on intestinal microbiota. Journal of Functional Foods, 86, 104704. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104704

Lopes, F. B., Da Silva, M. C., Miyagi, E. S., Fioravanti, M. C. S., Facó, O., Guimarães, R. F., Júnior, O. A. d. C., & McManus, C. M. (2012). Spatialization of climate, physical and socioeconomic factors that affect the dairy goat production in Brazil and their impact on animal breeding decisions. Pesquisa Veterinaria Brasileira, 32(11), 1073–1081. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100001

López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2012). Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 13, 200–206. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.10.012

Luz, C., Izzo, L., Ritieni, A., Mañes, J., & Meca, G. (2020). Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on Penicillium spp: An application as biopreservation agent in pita bread. LWT, 118, 108717. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108717

Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. New England Journal of Medicine, 375(24), 2369–2379. https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266

Ma, J.-J., Mao, X.-Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S.-W., & Li, Y.-H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. LWT - Food Science and Technology, 56(2), 296–302. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.019

Ma, Z., Zhang, F., Ma, H., Chen, X., Yang, J., Yang, Y., Yang, X., Tian, X., Yu, Q., Ma, Z., & Zhou, X. (2021). Effects of different types and doses of whey protein on the physiological and intestinal flora in D-galactose induced aging mice. PLOS ONE, 16(4), e0248329. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248329

Mangano, K. M., Bao, Y., & Zhao, C. (2019). Nutritional Properties of Whey Proteins. In Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781119256052.ch5

Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., & Sarkar, P. (2019). Bioactive Peptides from Whey Proteins. In Whey Proteins (pp. 519–547). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1

Mavrommatis, A., & Tsiplakou, E. (2020). The impact of the dietary supplementation level with Schizochytrium sp. on milk chemical composition and fatty acid profile, of both blood plasma and milk of goats. Small Ruminant Research, 193, 106252. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106252

Medeiros, G. K. V. V., Queiroga, R. C. R. E., Costa, W. K. A., Gadelha, C. A. A., e Lacerda, R. R., Lacerda, J. T. J. G., Pinto, L. S., Braganhol, E., Teixeira, F. C., Paula, P. P., Campos, M. I. F., Gonçalves, G. F., Pessôa, H. L. F., & Gadelha, T. S. (2018). Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. International Journal of Biological Macromolecules, 113, 116 123. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.200

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, S., Jana, A., Buttar, H. S., Telessy, I. G., Awuchi, C. G., Okpala, C. O. R., Korzeniowska, M., & Guiné, R. P. F. (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications. Journal of Functional Foods, 87, 104760. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104760

Mehra, R., Singh, R., Nayan, V., Buttar, H. S., Kumar, N., Kumar, S., Bhardwaj, A., Kaushik, R., & Kumar, H. (2021). Nutritional attributes of bovine colostrum components in human health and disease: A comprehensive review. Food Bioscience, 40, 100907. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100907

Meng, Y., Liang, Z., Zhang, C., Hao, S., Han, H., Du, P., Li, A., Shao, H., Li, C., & Liu, L. (2021). Ultrasonic modification of whey protein isolate: Implications for the structural and functional properties. LWT, 112272. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112272

Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. Dairy, 1(3), 233–258. https://doi.org/10.3390/dairy1030016

Mitsiopoulou, C., Sotirakoglou, K., Labrou, N. E., & Tsiplakou, E. (2021). The effect of whole sesame seeds on milk chemical composition, fatty acid profile and antioxidant status in goats. Livestock Science, 245, 104452. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104452

Mohan, A., Udechukwu, M. C., Rajendran, S. R. C. K., & Udenigwe, C. C. (2015). Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. RSC Advances, 5(118), 97400–97407. https://doi.org/10.1039/C5RA15140F

Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. In Food Industry. MUZZALUPO, I. Food Industry, Itália: EditoraInTech. https://doi.org/10.5772/53159

Mollica, M. P., Trinchese, G., Cimmino, F., Penna, E., Cavaliere, G., Tudisco, R., Musco, N., Manca, C., Catapano, A., Monda, M., Bergamo, P., Banni, S., Infascelli, F., Lombardi, P., & Crispino, M. (2021). Milk Fatty Acid Profiles in Different Animal Species: Focus on the Potential Effect of Selected PUFAs on Metabolism and Brain Functions. Nutrients, 13(4), 1111. https://doi.org/10.3390/nu13041111

Monteiro, M. G., Brisola, M. V., & Filho, J. E. R. V. (2021). TD 2660 - Diagnóstico da Cadeia Produtiva de Caprinos e Ovinos no Brasil. Texto Para Discussão, 1–31. https://doi.org/10.38116/td2660

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

Naik, L., Mann, B., Bajaj, R., Sangwan, R. B., & Sharma, R. (2013). Process optimization for the production of bio-functional whey protein hydrolysates: Adopting response surface methodology. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 19(3), 231–237. https://doi.org/10.1007/s10989-012- 9340-x

Nascimento, T. V. C., Oliveira, R. L., Menezes, D. R., de Lucena, A. R. F., Queiroz, M. A. Á., Lima, A. G. V. O., Ribeiro, R. D. X., & Bezerra, L. R. (2021). Effects of condensed tannin-amended cassava silage blend diets on feeding behavior, digestibility, nitrogen balance, milk yield and milk composition in dairy goats. Animal, 15(1), 100015. https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100015

O'Neill, G. J., Egan, T., Jacquier, J. C., O'Sullivan, M., & Dolores O'Riordan, E. (2014). Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilisation of riboflavin and peptides. Food Chemistry, 160, 46–52. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.002

Osman, A., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Badran, S. M., & Otte, J. (2016). Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. LWT - Food Science and Technology, 65, 480–486. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.043

Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2013). Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. Critical Reviews in Biotechnology, 33(4), 345–364. https://doi.org/10.3109/07388551.2012.709482

Park, Young W.; Haenlein, George F. W. ; Wendorff, W. L. (2017). Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. In Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals (2 nd, p. 712). Wiley-Blackwell Publishers.

Park, Y. W. (2006). Goat Milk-Chemistry and Nutrition. In Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals (pp. 34–58). Blackwell Publishing Professional. https://doi.org/10.1002/9780470999738.ch3

Park, Y. W. (2012). Goat Milk and Human Nutrition. Proceedings of the FIRST ASIA DAIRY GOAT CONFERENCE, 1(1), 31–39.

Park, Y. W., & Haenlein, G. F. W. (2021). A2 Bovine Milk and Caprine Milk as a Means of Remedy for Milk Protein Allergy. Dairy, 2(2), 191–201. https://doi.org/10.3390/dairy2020017

Pawlos, M. (2020). LOW-LACTOSE FERMENTED GOAT MILKS WITH BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS BB-12. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 9(4), 751–755. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.751-755

Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2010). Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 141(1–2), 73–81. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011

Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. Journal of Environmental Management, 110, 48–68. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018

Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D. L., Francesconi, A. H. D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. Journal of Dairy Science, 101(8), 6715–6729. https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015

Queiroz, E. S., Lopes Rezende, A. L., Perrone, Í. T., Francisquini, J. d'Almeida, Fernandes de Carvalho, A., Germano Alves, N. M., Cappa de Oliveira, L. F., & Stephani, R. (2021). Spray drying and characterization of lactose-free goat milk. LWT, 147, 111516. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111516

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Baines, S. K., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Pimentel, T. C., Wittwer, A. E., Naumovski, N., Graça, J. S., Sant'Ana, A. S., Ajlouni, S., & Vasiljevic, T. (2019). Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(4), 867–882. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12447

Razali, M. F., Narayanan, S., Md. Hazmi, N. A., Abdul Karim Shah, N. N., Mustapa Kamal, S. M., Mohd Fauzi, N. A., & Sulaiman, A. (2021). Minimal processing for goat milk preservation: Effect of high-pressure processing on its quality. Journal of Food Processing and Preservation, 45(7). https://doi.org/10.1111/jfpp.15590

Razzaghi, A., Naserian, A. A., Valizadeh, R., Ebrahimi, S. H., Khorrami, B., Malekkhahi, M., & Khiaosa-ard, R. (2015). Pomegranate seed pulp, pistachio hulls, and tomato pomace as replacement of wheat bran increased milk conjugated linoleic acid concentrations without adverse effects on ruminal fermentation and performance of Saanen dairy goats. Animal Feed Science and Technology, 210, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.014

Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D., & Prangdimurti, E. (2021). Identification of Angiotensin-I-converting inhibitory peptides in goat milk fermented by lactic acid bacteria isolated from fermented foods and breast milk. Food Science of Animal Resources. https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e55

Saipriya, K., Deshwal, G. K., Singh, A. K., Kapila, S., & Sharma, H. (2021). Effect of dairy unit operations on immunoglobulins, colour, rheology and microbiological characteristics of goat milk. International Dairy Journal, 121, 105118. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105118

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e6611124340, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24340

Sáiz-Abajo, M.-J., González-Ferrero, C., Moreno-Ruiz, A., Romo-Hualde, A., & González-Navarro, C. J. (2013). Thermal protection of β-carotene in re- assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. Food Chemistry, 138(2–3), 1581–1587. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.016

Salari, F., Altomonte, I., Ribeiro, N. L., Ribeiro, M. N., Bozzi, R., & Martini, M. (2016). Effects of season on the quality of Garfagnina goat milk. Italian Journal of Animal Science, 15(4), 568–575. https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1247658

Sarabandi, K., Sadeghi Mahoonak, A., Hamishekar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. Journal of Food Engineering, 237, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.036

Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides, 31(10), 1949–1956. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020

Schulmeister, U., Hochwallner, H., Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Geller, B., Nystrand, M., Härlin, A., Thalhamer, J., Scheiblhofer, S., Keller, W., Niggemann, B., Quirce, S., Ebner, C., Mari, A., Pauli, G., Herz, U., Valenta, R., & Spitzauer, S. (2009). Cloning, Expression, and Mapping of Allergenic Determinants of αS1-Casein, a Major Cow's Milk Allergen. The Journal of Immunology, 182(11), 7019–7029. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0712366

Sgarbieri, V. C. (2004). Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. Revista de Nutrição, 17(4), 397–409. https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001

Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. Small Ruminant Research, 89(2–3), 110–124. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033

Silva, P. D. L. da, Bezerra, M. de F., Santos, K. M. O. dos, & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. LWT - Food Science and Technology, 62(1), 452–457. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.055

Silva, N. N., Casanova, F., Pinto, M. da S., Carvalho, A. F. de, & Gaucheron, F. (2019). Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. Brazilian Journal of Food Technology, 22. https://doi.org/10.1590/1981-6723.18518

Silvestre, M. P. C., Silva, M. R., Silva, V. D. M., Souza, M. W. S. de, Lopes Junior, C. de O., & Afonso, W. de O. (2012). Analysis of whey protein hydrolysates: peptide profile and ACE inhibitory activity. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 48(4), 747–757. https://doi.org/10.1590/S1984- 82502012000400019

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-From "gutter-to-gold." International Dairy Journal, 18(7), 695–704. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008

Soliman, G. Z. A. (2005). Comparison Of Chemical And Mineral Content Of Milk From Human, Cow, Buffalo, Camel And Goat In Egypt. The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 21(1), 116–130. https://doi.org/10.21608/ejhm.2005.18054

Soloshenko, K. I., Lych, I. V., Voloshyna, I. M., & Shkotova, L. V. (2020). Polyfunctional properties of goat colostrum proteins and their use. Biopolymers and Cell, 36(3), 197–209. https://doi.org/10.7124/bc.000A2B

Sousa, G. T., Lira, F. S., Rosa, J. C., de Oliveira, E. P., Oyama, L. M., Santos, R. V, & Pimentel, G. D. (2012). Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review. Lipids in Health and Disease, 11(1), 67. https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-67

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tajaddini, M. A., Dayani, O., Khezri, A., Tahmasbi, R., & Sharifi-Hoseini, M. M. (2021). Production efficiency, milk yield, and milk composition and fatty acids profile of lactating goats feeding formaldehyde-treated canola meal in two levels of dietary crude protein. Small

Ruminant Research, 204, 106519. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106519

Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. Trends in Food Science & Technology, 37(1), 5–20. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.008

Tilg, H., Zmora, N., Adolph, T. E., & Elinav, E. (2020). The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. Nature Reviews Immunology, 20(1), 40– 54. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0198-4

Turkmen, N. (2017). The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components. In Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease (pp. 441–449). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00035-8

Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. Trends in Food Science & Technology, 36(2), 137–143. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.004

Vankadari, N., & Wilce, J. A. (2020). Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. Emerging Microbes & Infections, 9(1), 601–604. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1739565

Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. (2019a). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. Journal of Functional Foods, 52, 243–257. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017

Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. (2019b). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. Journal of Functional Foods, 52, 243–257. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.11.017

Watkins, P. J., Jaborek, J. R., Teng, F., Day, L., Castada, H. Z., Baringer, S., & Wick, M. (2021). Branched chain fatty acids in the flavour of sheep and goat milk and meat: A review. Small Ruminant Research, 200, 106398. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106398

Xia, S., Lan, Q., Su, S., Wang, X., Xu, W., Liu, Z., Zhu, Y., Wang, Q., Lu, L., & Jiang, S. (2020). The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. Signal Transduction and Targeted Therapy, 5(1), 92. https://doi.org/10.1038/s41392- 020-0184-0

Xia, Y., Yu, J., Xu, W., & Shuang, Q. (2020). Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from whey proteins of milk fermented with Lactobacillus plantarum QS670. Journal of Dairy Science, 103(6), 4919–4928. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17594

Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. Biotechnology Advances, 33(6), 756–774. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002

Zhang, Q.-X., Wu, H., Ling, Y.-F., & Lu, R.-R. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. Journal of Dairy Research, 80(3), 367–373. https://doi.org/10.1017/S0022029913000320

Zhou, D.-Y., Zhu, B.-W., Qiao, L., Wu, H.-T., Li, D.-M., Yang, J.-F., & Murata, Y. (2012). In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (Haliotis discus hannai Ino) viscera. Food and Bioproducts Processing, 90(2), 148–154. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.02.002

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi dividido em 05 etapas para melhor elucidar os objetivos estabelecidos. Conforme podemos visualizar na figura 1 a pesquisa se inicia com a obtenção do concentrado proteico do soro a partir do leite caprino. Nesta etapa foram aplicados processos de separação e purificação das proteínas e caracterização da matéria-prima (leite) e do soro.

Figura 1. Desenho geral metodológico do estudo

Na etapa 2 foi realizado o planejamento estatístico para otimização das condições de hidrólise do concentrado proteico obtido, a avaliação do modelo estatístico, caracterização do hidrolisado e escolha dos tratamentos que serão utilizados.

No decorrer do passo 3 os hidrolisados foram avaliados quanto a características tecnológicas, conformacionais, ao perfil peptídico e suas características, e a bioatividade *in vitro* e *in sílico* finalizando com a escolha da amostra que será utilizada nas etapas posteriores.

Na 4º fase o hidrolisado proteico que apresentou as características mais satisfatórias ao objetivo do estudo foi avaliado quanto as suas características estruturais, tecnológicas e os efeitos bioativos em um modelo *in vivo.*

O último passo é caracterizado pela encapsulação do hidrolisado do soro do leite. Para tal, inicialmente foram testadas as concentrações de material de parede e de núcleo que resultassem em melhor eficiência de encapsulação. Uma vez estabelecidos estes parâmetros foram avaliados a influencia da liofilização e da adição de um recobrimento com o concentrado proteico do soro do leite. Assim as cápsulas foram avaliadas quanto a eficiência de encapsulação e solubilidade, os melhores tratamentos foram analizados quanto a morfologia, propriedades tecnológicas e a digestibilidade e bioacessibilidade das cápsulas contendo os hidrolisados da proteína do soro do leite caprino.

3.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LEITE E DO SORO

3.2.1. Obtenção do leite caprino

As amostras de leite caprino foram cedidas pelo setor de caprinocultura, localizado no Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias – CCHSA/Bananeiras, Campus IV, da UFPB. O leite caprino foi obtido de animais sadios, com 4 meses de lactação (120 dias) de um rebanho misto, que pode ser observado na Figura 2 (A, B e C) sendo composto por 10 animais, sendo 7 cabras Saanen e 3 cabras da raça Parda.

Figura 2. Rebanho caprino do setor de caprinocultura do campus IV/UFPB

Fonte: O autor

As cabras recebiam dietas pré-estabelecidas pelos funcionários do setor e eram alimentadas em sistema confinado, a composição da dieta dos animais está descrita na tabela 1.

A ordenha manual era realizada pela manhã e em seguida os leites eram misturados e mantidos em tanques refrigerados.

Tabela 1. Composição das dietas dos animais

Ingredientes	Quantidade (%)*
Milho	14,693
Farelo de soja	4,990
Feno tifton	25,367
Óleo de linhaça	1,429
Suplemento mineral	0,714
Calcário calcítico	0,238
Farelo de trigo	2,567
Total	49,42

* Quantidade referente ao tempo de lactação 4 (120 dias)

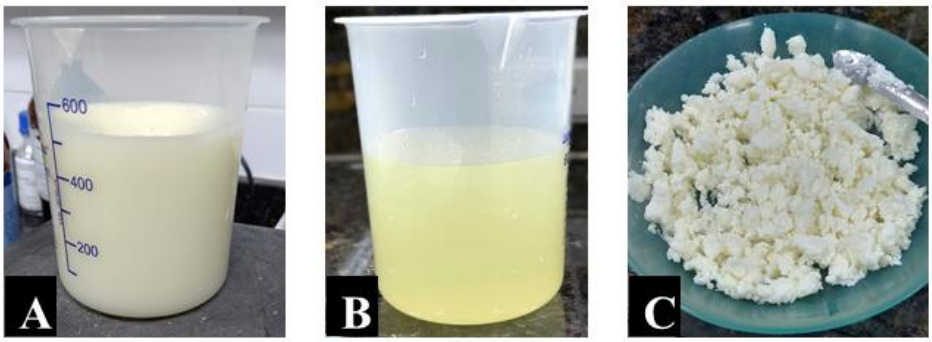
O leite foi transportado sob refrigeração em garrafas plásticas para a cidade de João Pessoa, onde foi homogeneizado, filtrado, desnatado em desnatadeira do tipo industrial (Capacidade de 50 L, modelo aberta 480 West) e congelados a -20 ºC até análises posteriores.

3.2.2. Produção do soro do leite caprino

O soro do leite foi obtido através da precipitação isoelétrica da caseína de acordo com a metodologia descrita por Egito et al. (2006) com modificações, o leite foi submetido a leve agitação e foi-se adicionando ácido clorídrico (HCl) 1 mol .⁻¹, até o alcance do pH 4,6.

O sistema foi deixado em repouso e após a precipitação da caseína e consequente mudança da coloração do líquido sobrenadante, o material foi submetido à centrifugação à frio (4000 g 20 min a 4 °C) para separação do soro da fração caseínica e de possíveis fragmentos remanescentes de gordura. Na Figura 3 podem ser visualizados separadamente leite (A), o soro (B) e a caseína (C). Por fim, o sobrenadante foi recolhido, filtrado e submetido a nova centrifugação nas condições anteriormente citadas para melhor purificar o soro.

Figura 3. Leite (A), fração soro (B) e caseína (C) obtidos após coagulação ácida



Fonte: O autor

Após testes de solubilidade, verificou-se necessária a modificação do pH do soro, que foi realizada mediante a adição de hidróxido de sódio, NaOH 1 mol.L^{-1} até pH 7, para ressolubilizar as proteínas. Em seguida o soro do leite foi dialisado contra água em membrana com porosidade de 3 kDA, para retirada do sal formado pela adição de HCl e NaOH, congelado a -20 ºC, e liofilizado em Liofilizador de bancada Liobras modelo L101 (280 µmHg/-40 ± 2 ºC/8 h) e o pó obtido foi armazenado longe da exposição da luz, em temperatura de 18 ± 2 ºC.

O valor de proteína solúvel foi monitorado ao longo dos processamentos que foram aplicados no soro, portanto o soro do leite liquido, após a dialise e após a liofilização foram quantificados pelo método de Bradford (1976).

3.2.3. Caracterização físico-química do soro do leite caprino

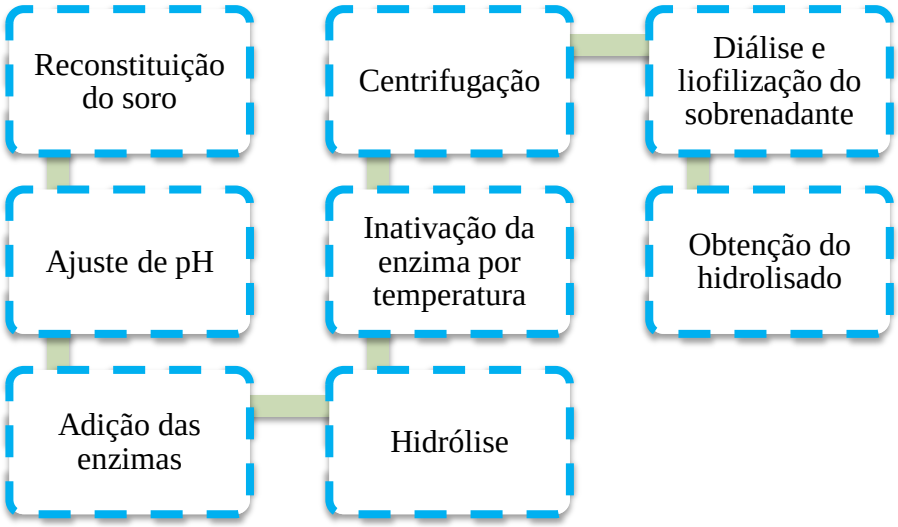
A amostra do soro do leite capino foi avaliada quanto ao teor de umidade (método gravimétrico por secagem em forno a 105°C – Protocolo 990,20), extrato seco total, cinzas (incineração em mufla a 550ºC, Protocolo 968.08), lipídeos (método de Gerber- Protocolo 2000.18), teor de atividade de água (Usando analisador Aqualab), acidez (AOAC, 2016), lactose, proteínas totais utilizando o fator e conversão do nitrogênio de 6,38 (Kjeldahl, 991.20) e a dosagem de proteínas solúveis pelo método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). O rendimento foi calculado com base na perda de água durante o processo de liofilização.

3.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática *in vitro* do soro caprino foi realizada a partir de modificações das metodologias definidas por Ahmed et al., (2015) e Tondo et al., (2020). A Figura 4 representa o fluxograma da condução dos experimentos de hidrólise.

O concentrado proteico do soro caprino foi ressolubilizado (6% p/v) em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) e deixado sob agitação por 60 min. Em seguida o pH ajustado com HCl 1 mol.L^{-1} e/ou NaOH 1 mol.L^{-1}. A proporção de enzima substrato utilizada foi de 1:50, os experimentos foram conduzidos em estufa incubadora shaker de bancada, com agitação de 180 rpm/min a 37 ºC para todos os experimentos. Após a reação a enzima foi inativada em banho-maria 85 ºC por 5 min, seguida de centrifugação a 2.000 g/10 min a 4 ºC. O sobrenadante foi recolhido, dialisado em água ultrapura em membranas de 500 Da, congelado e liofilizado.

Figura 4. Fluxograma da hidrólise das proteínas do soro do leite caprino



Inicialmente testes independentes foram realizados com as enzimas comerciais pepsina (da mucosa gástrica suína) e tripsina (de pâncreas bovino), para avaliar qual a melhor enzima para condução dos experimentos. Estas enzimas foram utilizadas por terem um custo mais acessível e uma alta eficiência proteolítica. Neste ensaio piloto manteve-se o pH ótimo de atividade das mesmas (3 e 7, sugeridos pelo fabricante) e o tempo máximo a ser avaliado no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) da etapa subsequente.

A partir dos valores do grau de hidrólise obteve-se que a melhor atividade proteásica foi com a ação da pepsina, assim prosseguiu-se com esta enzima para a otimização do processamento dos hidrolisados. Para tal, foi feito um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 incluindo quatro ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 2 e 3), sendo duas variáveis independentes: tempo de hidrólise T (X_1) e pH (X_2) e a função resposta foi o % de grau de hidrólise (% GH). A equação do modelo foi $Y=\beta_0+\beta_1 X_1+ \beta_2 X_2 + \beta_3.X_1X_2+ \beta_4.X_1^2+ \beta_5.X_2^2$ e o modelo ajustado aos dados experimentais foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e o coeficiente de determinação R^2. A superfície de resposta foi construída usando o software STATISTICA 5.0 (Statsoft Inc. Corporativo Tulsa, OK, EU).

Tabela 2. Níveis reais e codificados dos parâmetros do processo para hidrólise do soro leite caprino.

Variáveis independentes	**Níveis reais e codificados**				
	-α	-1	0	+1	+α
Tempo (min)	107,0	120	150	180	193,0
pH	1,2	1,4	2,2	3,0	3,2

Tabela 3. Planejamento experimental do tipo DCCR 2^2 com três repetições no ponto central

Ensaio	**Variáveis independentes**		**Variável Resposta**
	Tempo (min)	pH	Grau de hidrólise (%)
1	(-1) 120	(-1) 1,40	10,29
2	(+1) 180	(-1) 1,40	11,08
3	(-1) 120	(+1) 3,00	16,59
4	(+1) 180	(+1) 3,00	17,46
5	(0) 150	(-α 1,41) 1,20	14,05
6	(0) 150	(+α 1,41) 3,20	20,50
7	(-α 1,41) 107	(0) 2,25	8,98
8	(+α 1,41) 192	(0) 2,25	22,74
9	(0) 150	(0) 2,25	37,68
10	(0) 150	(0) 2,25	37,56
11	(0) 150	(0) 2,25	37,62

3.4. Caracterização dos hidrolisados proteicos do soro do leite caprino

3.4.1. Avaliação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado a partir da metodologia do OPA (o-ftaldialdeído) descrito por Silvestre et al., (2013) e Spellman et al., (2003) onde as amostras foram diluídas em concentração de 1mg.mL e 100 µL de amostra foram adicionados a 750 µL do reagente OPA, deixadas em descanso por 2 min. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. O cálculo do grau de hidrólise foi realizado através da equação:

$$\mathrm{GH}\ (\%) = \frac{\Delta\ \mathrm{Absx1{,}934d}}{\mathrm{c}}$$

Onde ΔAbs é o valor da absorbância da amostra teste subtraído do valor da absorbância da amostra não hidrolisada. O valor fixo de 1,934 é baseado no valor da massa molecular para as proteínas do soro do leite que é de 23644 Da, o componente d é o fator de diluição e c o valor obtido de proteína total pelo método de Kjeldahl.

3.4.2. Determinação de aminoácidos livres e da turbidez

O teor de aminoácidos livres foi mensurado a partir do método da ninidrina usando glicina como padrão (LIE, 1973). Em tubos de ensaio foram adicionadas 1 mL das amostras de hidrolisados (diluídas em água numa concentração 1 mg.mL) e 1 mL do reagente de ninidrina e em seguida estas foram submetidas a aquecimento em banho-maria a 85 ºC por 15 min seguido de banho-frio por 10 min a 20 ºC. Após o resfriamento do sistema foi adicionado 5 mL da solução de diluição e misturadas em vortex por 10 s. A absorbância foi lida em um comprimento de onda de 570 nm, os resultados foram expressos como alfaaminonitrogênio livre – Fan, por 200mg.L e a quantificação feita a partir o cálculo:

$$Fan = \frac{A1}{A2}\ x1\ x\ f$$

Onde, A1 corresponde a absorbância da amostra; A2 é referente a absorbância do padrão glicina; F é relativo ao fator de diluição da amostra;

Para determinação da turbidez as amostras foram solubilizadas em água ultrapura (1% p/v) e mantidas sob agitação leve por 2 h a 25 °C, e a absorbância foi medida a 600 nm (MARTINI; POTTER; WALSH, 2010).

3.4.3. Testes de solubilidade

Testes de solubilidades (em água) dos hidrolisados proteicos foram realizados a partir da metodologia de Morr et al., (1985) com modificações. As amostras foram diluídas em água ultrapura na concentração de 5 mg/mL e o pH ajustado para os valores 3, 5 e 7. Em seguida as soluções foram agitadas por 45 min em agitador magnético, centrifugadas a 1080 x g por 30 min a 4º C. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor de proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976).

3.4.4. Análise de fluorescência intrínseca

As medições de fluorescência intrínseca do concentrado proteico do soro do leite e dos hidrolisados foram realizadas em espectrofluorímetro usando comprimento de onda de excitação de 292 nm e de emissão coletado entre 300 e 420 nm. Os ensaios utilizaram como parâmetros: fendas de excitação e de emissão de 10 nm, velocidade da varredura de 200 nm min^{-1}, temperatura de 25 °C, e foram expressos em unidades arbitrárias u.a. (HINTOIU et al., 2011). As amostras foram diluídas em água ultrapura na concentração de 0,25 $mg.mL^{-1}$ e as leituras foram realizadas em triplicata.

3.4.5. Perfil de hidrofobicidade

As características polares e apolares das amostras de soro do leite caprino concentrado e dos hidrolisados foram avaliadas através de Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com a metodologia descrita por Bezerra et al., (2019) e Ostertag et al., (2021).

As amostras foram diluidas em água ultrapura na concentração de 5 mg.mL, homogeneizada por 2 min em vórtex, e submetidas a banho ultrassônico por 10 min. Em seguida foram centrifugadas a 2130 *g* /10 min a 4 º C e o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa de 0,45 µm de diâmetro.

As amostras após o tratamento foram analisadas quanto ao perfil de hidrofobicidade utilizando coluna C18 conectada em um sistema de cromatografia líquida de Alta Eficiência. A coluna foi previamente equilibrada com o eluente A (Ácido trifluoroacético a 1% em água ultrapura), e aplicou-se um volume de injeção de 20µL da amostra. Para eluição do material retido a coluna utilizou-se como fase móvel um gradiente linear de 5 a 100% do eluente A para B (Ácido trifluoroacético a 1% em Acetonitrila). Os picos foram detectados em 218 nm e o processo teve duração de 100 min mantendo-se um fluxo de 1mL.min^{-1}.

3.4.6. Análise da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi realizada nos hidrolisados proteicos do soro do leite por diferentes metodologias. Para avaliar o poder de redução total as amostras foram solubilizados na proporção de 1: 2,5:2,5 (m/v) com tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 6.6) e ferricianeto de potássio (1% p/v). A mistura foi levada a banho-maria a 50 ºC/30 min, após resfriamento foi adicionada uma solução de ácido tricloroacético (TCA 10% p/v) na mesma proporção, e centrifugada (2000g/ 5 min). O sobrenadante foi adicionado a água ultrapura (1:1 v/v) e a 200 µL da solução de cloreto de ferro III (1% p/v) e deixado em repouso por 10 min a ± 25 ºC. A absorbância foi medida a 700 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.) onde água destilada foi usada como branco e os resultados foram expressos em relação a absorbância (KRUNIĆ; RAKIN, 2022; OYAIZU, 1986).

Para o método FRAP - Poder antioxidante de redução do ferro procedeu-se o protocolo descrito por Rufino et al. (2006): Foram preparadas as soluções de 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina – TPTZ 10 mM diluída em uma solução de HCl 40 mM; Cloreto Férrico 20 mM; tampão acetato 0,3 M pH 3,6 e sulfato ferroso 2 mM. Para o preparo do reagente FRAP foram misturadas as soluções tampão, TPTZ e FeCl3 na proporção de 10:1:1. Em um tubo foi adicionado 2,7 mL do reagente FRAP e uma alíquota de 120 µL das amostras, incubados a 37 ºC por 30 min protegidos da luz. A absorbância foi medida no comprimento de 593 nm e utilizou o reagente FRAP como branco. Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão determinada com sulfato ferroso FeSO4 (500 a 2000 mM) e expressos em µmol de FeSO4/g de amostra.

As amostras foram avaliadas quanto a atividade antioxidante pela captura do radical ABTS+. A solução de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2.45 mM) foi preparada 12-16 h antes de ser utilizada e deixada em repouso protegia da luz em temperatura ambiente (± 25 ºC). Após o tempo, a solução de ABTS foi diluída em etanol 95% até obter 0,70 de absorbância (±0.02) em 734 nm. Para realização do ensaio 15 µL de cada amostra (10 mg.mL) foi misturado com 1,5 mL da solução de ABTS+, a mistura foi homogeneizada em vortex por 30 s e deixada no escuro por 6 min, a leitura da absorbância das amostras foi feita em 734 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.) (RUFINO et al., 2007).

A atividade antioxidante utilizando o radical DPPH foi feita de acordo com a metodologia de MORALES; JIMÉNEZ-PÉREZ (2001) com algumas modificações, 1950 µL da solução de DPPH 0,06 mM (solubilizada em metanol) foi misturada com 50 µL de cada amostra (10 mg/mL), mantidas em agitação por 30 min em ambiente escuro. Após esse tempo a leitura das absorbâncias foi medida a 517 nm, utilizando metanol como branco em um espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.).

Para as metodologias de ABTS e DPPH os resultados foram expressos em µmol de Trolox Equivalente (TE) / mg de proteína levando em consideração uma curva padrão de Trolox (100 µM – 2000 µM) e em percentual de atividade antioxidante de cada amostra comparando-se a curva-padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), como controle positivo e água ultrapura como controle negativo.

3.4.7. Avaliação do perfil peptídico por eletroforese Tris-Tricina

A ocorrência de proteínas de baixo peso molecular através da hidrólise foi verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Tricina (SDS-PAGE Tris-Tricina), de acordo com o método de Schägger & von Jagow, (1987). Os géis utilizados possuiam concentrações de acrilamida distintas sendo: gel de separação (16% T e 3% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C). Ao fim da corrida os géis foram fixados em solução fixadora (Metanol 10%, ácido acético 40%), corados em solução de Coomassie brilliant Blue G250 (0,025% de Comassie Blue em 10% ácido acético), durante 48 h e posteriormente descorados em solução descorante (ácido acético 10%). Marcadores de peso molecular foram utilizados para comparação entre os teores de proteínas (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, USA).

3.4.8. Identificação dos peptídeos do hidrolisado proteico por espectrometria de massas LC/MS

As amostras foram submetidas à extração em fase sólida com colunas-C18 do tipo Stage Tips e eluídas com 40% de acetonitrila. As StageTips foram montadas com uma resina do tipo InertSep RP-C18 (GL Sciences) e uma membrana SDB-XC (Empore, 3M) dentro de pontas de pipeta P200 (Rappsilber et al., 2007). Os materiais eluidos foram secos em um concentrador a vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf) e armazenados a -20°C até análise de MS. Os peptídeos foram quantificados medindo-se a absorbância em 480 nm (Synergy HT - Bio Tek) em placas de 96 poços, utilizando-se PierceTM Colorimetric Peptide Assay (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

As análises LC-MS/MS foram realizadas no sistema cromatográfico nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massa Synapt G2 HDMS (Waters). As amostras (5 µg) foram carregadas em uma coluna Trap (Acquity UPLC M-Class Symmetry C18, 100 Å, 5 µm, 300 µm x 25 mm, Waters) a 8 $\mu L.min^{-1}$ de 5% de acetonitrila e 0,1% ácido fórmico em água por 5 min. Em seguida, a mistura de peptídeos aprisionados foi eluída da coluna analítica (Coluna Acquity UPLC M-Class HSS T3, 1,8 µm, 300 µm x 150 mm, Waters) com um gradiente de 5-35% da fase B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), fase A (0,1%

de ácido fórmico em água), ao longo de 30 min a uma vazão de 3 µL.min^{-1}. Os dados MS foram adquiridos no modo independente de dados MSE, na faixa m/z de 50-2000 e configurados no modo resolução. Os íons peptídicos foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), na qual as energias de colisão foram alternadas entre baixa (4 eV) e alta (rampada de 23 a 58 eV) para íons precursores e íons fragmentos, respectivamente, usando o tempo de varredura de 1,0 s. A fonte ESI foi operada no modo positivo com voltagem capilar de 2,7 kV, temperatura do bloco de 100°C e voltagem do cone de 40 V. A temperatura da coluna foi ajustada em 55°C e as amostras foram mantidas em auto sampler a 10°C. Para correção de massa de bloqueio, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 fmol.mL^{-1} em 50% de metanol, 0,1% de ácido fórmico; Peptídeo 2,0) foi infundida através do pulverizador de referência a 2 µL.min^{-1} e amostrada a cada 60 s para calibração externa (PEDROSO et al., 2017).

As listas de picos de espectros MS/MS foram geradas no software Protein Lynx Global Server 3.0.3 (Waters) como arquivos .mzML e processadas pelo módulo Apex3D usando limite de baixa energia de 750 contagens e limite de alta energia de 50 contagens (Simizo et al., 2020). Em seguida, carregados no Peaks Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc.) e pesquisados no banco de dados Capra Hircus (Uniprot 257 entradas, data: 25 de dezembro de 2021). Os parâmetros de pesquisa foram definidos da seguinte forma: tolerância de massa de 10 ppm para íons precursores e 0,025 Da para íons fragmentos, De novo (ALC ≥ 50%), -10LogP ≥ 50 no nível de peptídeo e ≥ 20 no nível de proteína, com mínimo de 1 peptídeo único. Acetilação N-terminal e oxidação de metionina foram definidas como modificações variáveis. Pepsina: local de clivagem estabelecido após Phe, Leu, Tyr, Trp; máx. 5 clivagens perdidas, clivagens não específicas em ambos os lados.

3.4.9. Análises *in sílico*

Os peptídeos identificados por espectrometria de massas foram avaliados por ferramentas de bioinformática para predição de diferentes parâmetros e características. A predição da bioatividade foi feita utilizando duas ferramentas, o servidor Peptide Ranker que se baseia em uma nova rede neural N-para-1 baseada na probabilidade do peptídeo ser bioativo utilizando uma calibração limitada a 0,5, ou seja, qualquer peptídeo rankeado acima deste valor é rotulado como bioativo (MOONEY et al., 2012).

Além disso as sequências foram submetidas a busca na base de dados online BIOPEP utilizando a ferramenta *peptide calculator* que retorna dois valores distintos A e B. O parâmetro A é a frequência da ocorrência dos fragmentos bioativos em uma sequência da proteína e o B a potencial atividade biológica desta sequência (MINKIEWICZ; IWANIAK; DAREWICZ, 2019).

A avaliação da alergenicidade das amostras foi realizada utilizando a ferramenta AllerTOP e a toxicidade dos peptídeos pelo ToxinPred Estas duas ferramentas podem ser acessadas pelos endereços eletrônicos https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/ http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/ (DIMITROV et al., 2014; GUPTA et al., 2013).

As características físico químicas das sequências dos peptídeos obtidas foram preditas com as seguintes ferramentas: Expasy-Compute (http://web.expasy.org/compute_pi/) usada para estimar o ponto isoelétrico e a massa molecular (Da), a grande média de hidropaticidade (GRAVY), o índice de instabilidade, a fórmula química e o índice alifático. A carga neutra, a hidrofobicidade e o comprimento da cadeia foram estimados pela ferramenta PepDraw (https://pepdraw.com/).

Com base nos resultados anteriores, foram selecionados os peptídeos que possuíssem maior similaridade com os preditos e que apresentassem maior potencial de bioatividade para poder estimar a composição química e sua fórmula estrutural utilizando a ferramenta PepDraw (TU et al., 2018).

Por fim, dentre os 3 hidrolisados analisados foi escolhido para as etapas subsequentes aquele ao qual as características bioativas pelos métodos *in sílico* e *in vitro* demonstraram maior potencial.

3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E TECNOLÓGICA

3.5.1. Espectroscopia de dicroísmo circular - CD

A estrutura secundária foi investigada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em um espectropolarímetro J-815, equipado com um termocontrolador PTC-423S/15 Peltier (JASCO, Tóquio, Japão).

As mostras de soro nativo e do hidrolisado no tempo de 150 min foram solubilizados em água ultrapura, clarificados por centrifugação a 10.000 × g por 10 min e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 280 nm. As medições dos espectros de CD das amostras com uma concentração final de proteína/peptídeo de ≈ 0,2 mg/mL foram feitas a 20 °C em uma faixa espectral de 180-260 nm, usando uma cubeta de quartzo (l = 0,05 cm), velocidade de varredura de 50 nm/min, largura de banda de 2,0 nm, tempo de resposta de 1,0 s, passo de dados de 0,5 nm e um fluxo constante de gás nitrogênio para evitar interferência de oxigênio.

Os espectros de CD finais correspondem a 20 medições, que foram acumuladas, calculadas em média e corrigidas a partir de água ultrapura (COSTA et al., 2021; GRABNER et al., 2017; LAKOWICZ, 1983). Como as amostras eram constituídas por mistura de proteínas ou peptídeos com proporções e pesos moleculares indefinidos, esses espectros de CD foram normalizados para elipticidade específica a partir do comprimento do caminho óptico (l) e concentração de massa. A estimativa de conteúdo das estruturas secundárias para cada amostra foi realizada no servidor online DichroWeb (MILES; RAMALLI; WALLACE, 2022), usando o algoritmo CDSSTR (Johnson, 1999) e os graus experimentais de elipticidade (θ) e alcance espectral (λ) como os dados de entrada.

3.5.2. Caracterização do tamanho da estrutura proteica

O soro do leite caprino concentrado e o hidrolisado foram analisados por dispersão dinâmica de luz -DLS em um instrumento DynaPro Titan (Wyatt Technology, Santa Barbara, EUA) para determinação do tamanho das partículas. As amostras foram solubilizadas em água ultrapura, filtradas em membrana hidrofílica de PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro (Millex – Millipore, Burlington, EUA), clarificadas e quantificadas. As medições DLS das amostras com concentração final de proteína/peptídeo de ≈ 3,5 mg/mL foram feitas a 20°C, usando uma cubeta de quartzo (l = 0,15 cm).

Para cada amostra, foram coletadas 10 aquisições de 10 s cada após a estabilização da temperatura e potência do laser (CARDOSO et al., 2020, 2021; GOMES et al., 2020; MAGRO et al., 2020). Assim, a distribuição dos tamanhos das partículas foi expressa em raio hidrodinâmico e polidispersidade.

3.5.3. Análise termogravimétrica-TG acoplada a calorimetria exploratória diferencial – DSC

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada nas amostras de soro do leite concentrado, hidrolisado livre e nas cápsulas utilizando um analisador termogravimétrico SHIMADZU modelo DTG-60 H. O ensaio não isotérmico foi feito utilizando 10 mg de amostra, em cadinho de aluminio com atmosfera de ar sintético e o protocolo seguido foi: vazão de 50 mL/min, taxa de aquecimento de 10 °C/min, rampa de 25 a 800 °C. Os parâmetros térmicos das cápsulas foram avaliados por calorimetria exploratória diferencial (DSC-60 SHIMADZU) operada com gás nitrogênio a 20 mL/min onde as amostras foram aquecidas até 550 °C a uma taxa de 10 °C/min.

3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura- MEV

A morfologia das amostras do soro do leite concentrado, hidrolisado e das cápsulas foi avaliada usando microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 com detector eletro secundário (Zeiss, Goettingen, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 10 kV. A amostra foi colocada sobre papel adesivo carbono e recoberta com ouro 200 Å (ångstrom), a distância de trabalho foi de 10 e a ampliação foi 200 a 1000 vezes conforme adaptação da metodologia de CUI et al. (2021b).

3.5.5. Capacidade de formação de espuma

A habilidade de formação de espuma (FE) foi realizada de acordo com a metodologia de CAESSENS et al. (1997) com modificações. As amostras solubilizadas em água ultrapura (1%, p/v) foram colocadas em provetas de vidro graduadas e homogeneizadas a 4000 rpm/1 min em Ultra-turrax. FE foi calculada de acordo com a fórmula:

$$FA\ (\%) = \frac{V_0 - V_1}{V_0} x100$$

Onde V0: Volume inicial; V1: Volume após homogeneização

O comportamento e a morfologia das bolhas foram avaliados através de microscopia ótica, utilizando um microscópio ótico (Olympus BX41) com aumento de 5X.

3.5.6. Índice de atividade emulsificante

Para determinar o índice de atividade emulsificante uma alíquota de 3 mL das amostras na concentração 0,2% (p/v) foi homogeneizada com 1 mL de óleo de milho (ϕ, fração de volume da fase dispersa = 0,25) em um Ultra-turrax por 3 min a 20.000 rpm. Após a homogeneização 20 µL da emulsão foi adicionado a 10 mL de SDS a 0,1 %, correspondente a uma diluição da proteína de 1/500, e a absorbância foi imediatamente mensurada a 500 nm (CHICÓN et al., 2009). A conversão do valor da absorbância para a unidade EAI ($m^2.g^{-1}$) foi feita de acordo com a seguinte fórmula (PEARCE; KINSELLA, 1978).

$$EAI\ (m^2.g^{-1}) = 2T\ /\Phi C$$

Onde, T: Turbidez = 2,3; A: absorbância a 500 nm; I: é o comprimento do caminho da luz (m); Φ: fração de volume da fase dispersa; C: concentração de proteínas antes da formação da emulsão.

3.6. Ensaio comportamental *in vivo* com modelo Zebrafish (*Danio rerio*)

Os peixes-zebras (*Danio rerio*) silvestres com idade de 90 a 120 dias, peso 0,4 ± 0,1 g, e tamanho de 3,5 ± 0,5 cm, de ambos os sexos foram adquiridos em loja local (Fortaleza, CE). Os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro de 24 h e ciclo circadiano de 10 - 14 h (claro/escuro) imersos em aquário de vidro (30 × 15 × 20 cm) de 10 L (n = 3 / L) com água clorada (ProtecPlus®) e bomba de ar com filtros submersos, sob uma temperatura de 25 ° ± 2 ° C, pH 7,0. Os peixes receberam ração (Spirulina®) *ad libitum* 24 h antes dos experimentos.

Previamente as aplicações dos medicamentos os animais foram anestesiados em água gelada e após os experimentos, foram sacrificados por imersão em água gelada (2 e 4 ° C) por 1 min até a perda dos movimentos operculares. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; nº 04983945/2021), estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal.

Os peixes de ambos os sexos foram selecionados aleatoriamente nos experimentos, anestesiados em água gelada, transferidos para uma esponja úmida onde os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (i.p). Os animais foram divididos nos grupos (n=6): grupo teste tratado com 20 µL do hidrolisado (4; 20 e 40 mg/kg); o grupo tratado com Diazepam (4 mg/kg - controle positivo) e o grupo tratado com dimetilsulfóxido - DMSO 3 % (Controle negativo - diluente das drogas). Para os testes do sistema GABergico os animais receberam flumazenil (4 mg/kg; 20 µL; 20 µL), um antagonista do ácido γ-aminobutírico tipo A - GABAA. Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em béquer de vidro com 150 mL de água do aquário e mantidos em repouso para as análises subsequentes.

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar a presença ou ausência de alterações na coordenação motora nos animais (FERREIRA et al., 2021), seja devido ao efeito ansiolítico e / ou de relaxamento muscular.

Após o teste de campo aberto, os animais foram deixados em repouso para análise da taxa de mortalidade por um período de 96 h, registrando-se a cada 24 h o número de peixes mortos em cada grupo (OECD, 1992). A dose letal capaz de matar 50 % dos animais (DL50) foi determinada pelo método matemático Trimmed Spearman-Karber com intervalo de confiança de 95%.

O ensaio comportamental para avaliação da ansiedade dos animais foi realizado em um aquário de vidro (30 cm x 15 cm x 20 cm) dividido em uma área clara e uma área escura. O aquário foi cheio até 3 cm com água da torneira sem cloro, o que simulou um novo ambiente

raso diferente do aquário convencional e capaz de induzir comportamentos de ansiedade. Após 1 h os animais foram colocados individualmente na zona clara e o efeito ansiolítico foi medido com base no tempo gasto na zona clara do aquário durante 5 min de observação (GEBAUER et al., 2011). A dose que apresentou melhor efeito ansiolítico foi usada para a condução dos testes posteriores.

A neuromodulação GABAérgica envolvida no efeito ansiolítico do hidrolisado foi avaliada através do pré-tratamento com flumazenil antes do teste claro/escuro (BENNEH et al., 2017). O flumazenil foi administrado nos animais e após 15 min, foi aplicado o hidrolisado, decorrida 1 h dos tratamentos, os animais foram submetidos de novo ao teste claro/escuro descrito na seção anterior.

A reversão da convulsão induzida por pentilenotetrazol-PTZ foi investigada como descrito por (SIEBEL et al., 2015). Os animais foram expostos individualmente por imersão em 7,5 mM de PTZ (dissolvido em água) e o comportamento semelhante à convulsão em três estágios foi avaliado de acordo com as seguintes características: estágio I - aumento drástico da atividade natatória; estágio II - comportamento em redemoinho; estágio III - crises semelhantes ao clônus, seguidas de perda de postura com ocorrência de queda do animal para o lado e imóbilidade por 1-3 s. Ao final da avaliação das três etapas do teste, os animais foram eutanasiados no gelo.

O envolvimento do sistema GABAAérgico na reversão da convulsão também foi avaliado. Os peixes receberam flumazenil e após 15 min foram tratados com hidrolisado (4 mg/kg; 20 µL; i.p.). Após 1 h de tratamentos, os animais foram expostos individualmente a 7,5 mM de PTZ e os três estágios de convulsão foram avaliados conforme descrito anteriormente (FERREIRA et al., 2021).

3.7. MICROENCAPSULAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO

3.7.1. Fabricação das cápsulas contendo o hidrolisado

A encapsulação do hidrolisado proteico do soro caprino foi realizada pelo método de gelificação iônica de acordo com a metodologia descrita por MA, et al., (2014) e LOPES NETO et al. (2021). Testes pilotos foram realizados para estabelecer a quantidade de amostra a qual

melhores resultados de eficiência de encapsulação eram obtidos. Dessa forma foram testadas concentrações de 01, 05 e 10 mg.mL com base em trabalhos prévios realizados com hidrolisados de proteína (ALVARADO et al., 2019; MA et al., 2014; SARABANDI; GHAREHBEGLOU; JAFARI, 2020).

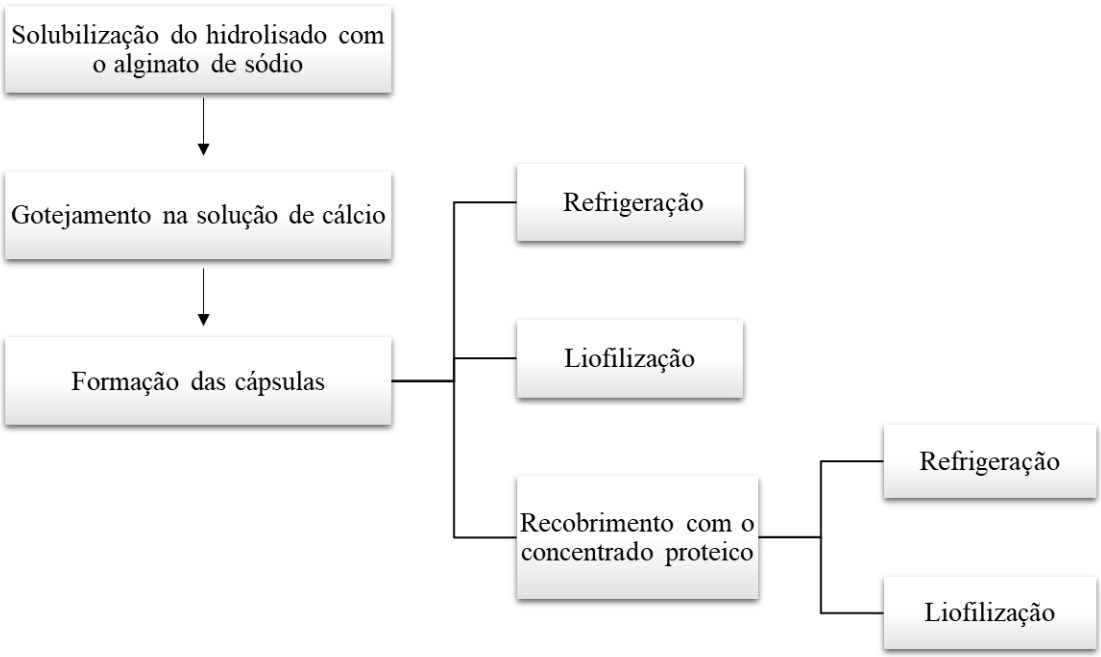
A fabricação das cápsulas se deu pela técnica de extrusão. A amostra foi solubilizada em água destilada e misturada com a solução de alginato de sódio. O sistema foi mantido sob agitação lenta por 30 min para garantir a mistura dos componentes. A seguir a solução biopolimérica contendo o hidrolisado foi gotejada utilizando uma seringa de 1 mL, em uma distância de aproximadamente 30 cm, em uma solução de cloreto de cálcio (4% p/v) sob agitação continua e branda.

Após a formação das cápsulas estas foram mantidas em repouso na solução de cálcio por 30 min para completar a gelificação, em seguida filtradas (utilizando papel filtro qualitativo tipo Whatman® 3MM n.4) e lavadas com água destilada. Para todos os passos posteriores foi seguido esse protocolo de fabricação.

Uma vez que a concentração ideal foi estabelecida, foi verificada a influência de dois tratamentos nas cápsulas: o recobrimento com uma solução de concentrado proteico do soro caprino a 5% e a secagem das cápsulas por liofilização. Após a lavagem com água destilada as cápsulas foram submergidas em uma solução de soro concentrado a 5% durante 60 min, cuidadosamente transferidas para placas de petri, congeladas (-20 ºC) e liofilizadas ou mantidas sob refrigeração.

Assim 4 diferentes grupos de acordo com o tipo de tratamento ao qual as cápsulas foram submetidas foram organizados (figura 5): O grupo controle-T0 consistia da cápsula fabricada com alginato sem revestimento e sem secagem; O grupo T1 abrangia as cápsulas recobertas com o soro, mas que não foram liofilizadas; O grupo T2 compreendia as cápsulas liofilizadas, mas sem adição do revestimento; E no grupo T3 constam as cápsulas liofilizadas e revestidas.

Figura 5. Fluxograma do processo de elaboração das cápsulas contendo o hidrolisado do soro do leite caprino



3.7.2. Taxa e eficiência de encapsulação – EE

O cálculo da taxa de encapsulação foi mensurado de acordo com a relação entre o conteúdo de proteína adicionado à solução biopolimérica e o conteúdo de proteína que ficou disperso na solução de cloreto de cálcio pelo método de Bradford (1976).

Para a avaliação da eficiência de encapsulação foi realizado o método descrito por Sarabandi et al. (2019). As cápsulas foram solubilizadas (20 mg em 2 mL de água destilada) e centrifugadas por 10 min a 2500×*g*, e o conteúdo de proteína no sobrenadante foi avaliado. Assim a EE (%) foi calculada com base na quantidade de proteína no sobrenadante em relação a quantidade de proteína inicial adicionada.

3.7.3. Solubilidade

Para avaliação da solubilidade das cápsulas a amostras foram diluídas em água destilada em uma concentração de 1% (p/v), o pH foi ajustado (T: 25 ºC) com 1M HCl ou 1M

NaOH para 3, 5 e 7. Em seguida as cápsulas foram centrifugadas a 20000*g*/15min/23 °C e uma alíquota do sobrenadante foi diluída (1:10) em um tampão de dissociação (0,5M EDTA, 8M Urea pH 10) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 280 nm. A solubilidade foi calculada a partir da razão entre a absorbância do sobrenadante e da suspensão antes de centrifugada (GIROLDI et al., 2022; JAMBRAK et al., 2014). Os tratamentos que apresentaram os resultados mais satisfatórios das análises de eficiência de encapsulação e solubilidade foram selecionados para prosseguir com as etapas subsequentes.

3.7.4. Avaliação de propriedades morfológicas e físico-químicas

As cápsulas imediatamente após o processo de preparação foram analisadas usando microscópio óptico (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Reino Unido) com ampliação de 5 ×. Para melhor visualização da superfície as capsulas foram coradas com uma alíquota de 100 uL do reagente de Bradford (KRUNIĆ; RAKIN, 2022). Para a avaliação da fórmula do granulo e o cálculo do fator de esfericidade foi utilizada a seguinte equação:

SF=(dmax-dper)/(dmax+dper)

Onde tem se que: SF = fator de esfericidade; dmax = diâmetro máximo que passa pelo centro da amostra (mm); dper = diâmetro perpendicular ao dmax que passa pelo centro da amostra (mm).

A morfologia das micropartículas também foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura com detector eletrosecundário, Modelo LEO 1430 (Zeiss, Goettingen, Alemanha**).** As amostras foram dispostas em papel adesivo de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro 200 Å (ångström) a análise procedeu a uma tensão de aceleração de 10 kV, distância de trabalho de 10 mm e a magnitude de ampliação variou entre 50 a 100x (GIROLDI et al., 2022; LOPES NETO et al., 2021).

A higroscopicidade das cápsulas foi avaliada segundo o método descrito por CAI; CORKE (2000) com as modificações realizadas por DE SOUZA et al. (2019). As amostras foram dispostas em recipientes de plástico e foram inseridas em sistema de atmosfera controlada, contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa 75,29%), mantidas em estufa a 25 ºC por 7 dias. A higroscopicidade foi expressa como g de umidade absorvida por 100 g de sólidos secos (g/100 g). A atividade de água (AOAC, 2016) das amostras foi monitorada antes de iniciar a análise de higroscopicidade e ao final dos 7 dias.

3.7.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier –FTIR

A análise foi realizada no espectrofotômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige 21 SHIMADZU, Japão), utilizando o método de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de transmitância, na faixa de 4000 a 600 cm-1, com resolução de 4 cm-1 e 20 varreduras (LI et al., 2020).

3.7.6. Difração de raios X –DRX

As estruturas cristalinas das microcápsulas foram investigadas por difratôgrama de raios X equipado com tubo de cobre, usando radiação Cu-Kα (1,5418 Å) com comprimento de onda de 1,5418°A a uma tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. As amostras foram analisadas em uma faixa angular de difração de $2\theta = 10°–50°$ com velocidade de $2° \text{ min}^{-1}$ (FLORENTINO et al., 2022).

3.7.7. Avaliação da digestibilidade gastrointestinal e da bioacessibilidade

O comportamento das cápsulas frente as condições simuladas do trato gastrointestinal foi avaliada a partir da metodologia descrita por Minekus et al. (2014), utilizando os protocolos sugeridos para as fases digestivas: oral, gástrica e intestinal.

Para realização do protocolo de digestão foram preparadas as seguintes soluções: O fluido salivar foi obtido preparando uma solução de pH 7 composta por fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e cloreto de sódio (NaCl) dissolvidos em água destilada, alfa-amilase (EC 3.2.1.1) foi adicionada à mistura para obter 200 U de atividade enzimática; O fluído gástrico foi obtido pela mistura de 0,31% de enzima pepsina, EC 3.4.23.1 e NaCl 0,03 M. O valor do pH foi ajustado para pH 2,0 com HCl 1 M. O

fluido intestinal foi preparado dissolvendo pancreatina e extrato de bile suína em uma solução de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) 0,1 M pH 6.

A digestão simulada iniciou nas condições estabelecidas para a fase oral onde o fluido salivar foi colocado em contato com 50 mg das cápsulas e incubado a pH 7 por 2 min. Em seguida, para dar inicio fase gástrica, foi adicionado à solução o fluido gástrico e as amostras foram incubadas sob agitação nas condições pH 3 por 120 min. Após o fim da fase gástrica, o fluido intestinal foi adicionado ao sistema, o pH ajustado para 7 (utilizando NaOH 1 M), o sistema foi incubado sob agitação por 120 min.

Todo o protocolo foi realizado em incubadora tipo shaker sob condições fixas de 37 ºC e 150 rpm. O hidrolisado não encapsulado também foi submetido as mesmas condições de digestão para possibilitar a comparação com o material encapsulado. Para acompanhar a liberação dos peptídeos ao longo da digestão foram retiradas alíquotas no fim da fase salivar e gástrica. As enzimas foram inativadas centrifugando as amostras a 3000 x *g* por 20 min.

A biodisponibilidade das amostras após a digestão foi avaliada a partir da determinação do percentual de inibição de DPPH. Enquanto que a bioacessibilidade foi avaliada com base no conteúdo de peptídeos. Para tal, o conteúdo da amostra digerida foi inserido em sacos de diálise de 3 kDa, imersos na solução de fluido intestinal e incubado a 37 ºC por 120 min em 50 rpm. Após o fim do processo a amostra foi centrifugada a 3000 x *g* por 20 min e o conteúdo de proteína do sobrenadante determinado. O cálculo da bioacessibilidade foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$IVB\ (\%) = 100 \times (PT_d / PT_i)$$

PT*d* é o teor de peptídeos da amostra digerida após a diálise; PT*i* é o teor de peptídeos inicial da amostra não digerida.

3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância *one way* (ANOVA). As diferenças entre os grupos estudados foram analisadas utilizando o teste de média Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância, ou teste *T* empregando o software GraphPad Prisma para Windows (GraphPad Software, Inc. versão 7.0) assim como os diagramas e tabelas das análises de bioinformática. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$. Os resultados do planejamento

experimental foram avaliados utilizando o software STATISTICA 7. Os gráficos referentes as análises de fluorescência intrínseca, FTIR, TGA, DSC, DRX foram ajustados pelo software ORIGIN PRO 8.5.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; LICEAGA, A. M.; ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L. Encapsulation of bioactive peptides: a strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 12, n. 11, p. 6449–6458, 2022. DOI: 10.1039/D1RA08590E. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=D1RA08590E.

AHMED, Ahmed S.; EL-BASSIONY, Tawfik; ELMALT, Laila M.; IBRAHIM, Hisham R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, *[S. l.]*, v. 74, p. 80–88, 2015. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.04.032. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915001957.

ALIZADEH, Omar; ALIAKBARLU, Javad. Effects of ultrasound and ohmic heating pretreatments on hydrolysis, antioxidant and antibacterial activities of whey protein concentrate and its fractions. **LWT**, *[S. l.]*, v. 131, p. 109913, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109913. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820309026.

ALVARADO, Yolanda; MURO, Claudia; ILLESCAS, Javier; DÍAZ, María del Carmen; RIERA, Francisco. Encapsulation of antihypertensive peptides from whey proteins and their releasing in gastrointestinal conditions. **Biomolecules**, *[S. l.]*, v. 9, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/biom9050164. Disponível em: https://www.mdpi.com/2218-273X/9/5/164

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. *In*: **AOAC International**. Rockville, MD.

BABA, Waqas N.; BABY, Bincy; MUDGIL, Priti; GAN, Chee-Yuen; VIJAYAN, Ranjit; MAQSOOD, Sajid. Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides. **LWT**, *[S. l.]*, v. 143, p. 111135, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111135. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643821002887.

BELTRÁN, M. C.; SANNA, A.; QUINTANILLA, P.; MONTES, R.; MOLINA, M. P. Quinolones in goats' milk: Effect on the cheese-making process, chemical and microbial characteristics of acid-coagulated cheeses. **International Dairy Journal**, *[S. l.]*, v. 138, p. 105538, 2023. DOI: 10.1016/j.idairyj.2022.105538. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694622002229.

BENNEH, Charles Kwaku; BINEY, Robert Peter; MANTE, Priscilla Kolibea; TANDOH, Augustine; ADONGO, Donatus Wewura; WOODE, Eric. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and

5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, *[S. l.]*, v. 207, p. 129–145, 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2017.06.012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874116318311.

BEZERRA, Taliana Kênia Alencar; DE LACERDA, José Thalles Jocelino Gomes; SALU, Bruno Ramos; OLIVA, Maria Luiza Vilela; JULIANO, Maria Aparecida; PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; MADRUGA, Marta Suely. Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory and Anticoagulant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Chicken Combs and Wattles. **Journal of Medicinal Food**, *[S. l.]*, v. 22, n. 12, p. 1294–1300, 2019. DOI: 10.1089/jmf.2019.0066. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2019.0066.

BORBA, K. K. S. et al. Fatty acids, essential amino acids, minerals and proteins profile in whey from goat cheese: Impacts of raising system. **Small Ruminant Research**, *[S. l.]*, v. 217, p. 106842, 2022. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2022.106842. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448822002310.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *[S. l.]*, v. 254, p. 248–254, 1976.

CAESSENS, Petra W. J. R.; GRUPPEN, Harry; VISSER, Servaas; VAN AKEN, George A.; VORAGEN, Alphons G. J. Plasmin Hydrolysis of β-Casein: Foaming and Emulsifying Properties of the Fractionated Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 45, n. 8, p. 2935–2941, 1997. DOI: 10.1021/jf9700889. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9700889.

CAI, Y. Z. Productio. and Properties of Spray-dried; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried. **Journal of Food Science**, *[S. l.]*, v. 65, n. 3600, p. 1248–1252, 2000.

CAMPOS, Maria Isabel Ferreira et al. Characterization of goat whey proteins and their bioactivity and toxicity assay. **Food Bioscience**, *[S. l.]*, v. 46, p. 101591, 2022. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.101591. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429222000505.

CARDOSO, Fábio F.; DE SOUZA, Maximilia F.; OLIVEIRA, Cristiano L. P.; FONTES, Marcos R. M. In-solution structural studies involving a phospholipase A2-like myotoxin and a natural inhibitor: Plasticity of oligomeric assembly affects mechanisms of inhibition. **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 181, p. 145–153, 2021. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.12.008. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030090842030328X.

CARDOSO, Fábio F.; GOMES, Antoniel A. S.; DREYER, Thiago R.; CAVALCANTE,

Walter L. G.; DAL PAI, Maeli; GALLACCI, Márcia; FONTES, Marcos R. M. Neutralization of a bothropic PLA2-like protein by caftaric acid, a novel potent inhibitor of ophidian myotoxicity. **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 170, p. 163–172, 2020. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.01.010. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908420300122.

CHAMATA, Yara; JACKSON, Kim G.; WATSON, Kimberly A.; JAUREGI, Paula. Whey-derived peptides at the heart of the covid-19 pandemic. **International Journal of Molecular Sciences**, *[S. l.]*, v. 22, n. 21, 2021. DOI: 10.3390/ijms222111662. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34769093/

CHICÓN, Rosa; BELLOQUE, Josefina; ALONSO, Elena; LÓPEZ-FANDIÑO, Rosina. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. **Food Hydrocolloids**, *[S. l.]*, v. 23, n. 3, p. 593–599, 2009. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.04.001. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X08000635.

COSTA, Tássia R. et al. Gallic acid anti-myotoxic activity and mechanism of action, a snake venom phospholipase A2 toxin inhibitor, isolated from the medicinal plant Anacardium humile. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 185, p. 494–512, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.163. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021013921.

CUI, Qiang; WANG, Lin; WANG, Guorong; ZHANG, Anqi; WANG, Xibo; JIANG, Lianzhou. Ultrasonication effects on physicochemical and emulsifying properties of Cyperus esculentus seed (tiger nut) proteins. **Lwt**, *[S. l.]*, v. 142, n. October 2020, p. 110979, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.110979. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110979.

DE SOUZA, Renata Silva Cabral; TONON, Renata Valeriano; STEPHAN, Marília Penteado; SILVA, Caroline Mellinger; PENTEADO, Ana Lúcia; CABRAL, Lourdes Maria Corrêa; KUROZAWA, Louise Emy. Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. **Brazilian Journal of Food Technology**, *[S. l.]*, v. 22, 2019. DOI: 10.1590/1981-6723.02118. Disponível em: https://www.scielo.br/j/bjft/a/mH5VMGcxhyGFrjv7hSppyJd/?lang=pt

DIMITROV, Ivan; BANGOV, Ivan; FLOWER, Darren R.; DOYTCHINOVA, Irini. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. **Journal of Molecular Modeling**, *[S. l.]*, v. 20, n. 6, p. 2278, 2014. DOI: 10.1007/s00894-014-2278-5. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00894-014-2278-5.

DU, Xiaojing; JING, Huijuan; WANG, Li; HUANG, Xin; WANG, Xuefeng; WANG, Hongxin. Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. **LWT**, *[S. l.]*, v. 159, p. 113257, 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113257. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364382200192X.

DYBDAHL, Marianne; SELESKO, David Benjamin; MIKKELSEN, Ulla Ramer. Safety evaluation of whey derived beta-lactoglobulin, Lacprodan® BLG. **Toxicology Reports**, *[S. l.]*, v. 8, p. 617–626, 2021. DOI: 10.1016/j.toxrep.2021.03.012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750021000536.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecçã o da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, *[S. l.]*, v. 58, n. 5, p. 932–939, 2006. DOI: 10.1590/S0102-09352006000500032. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abmvz/a/H9RyQXpBhv4W4ycss3jKLHK/?lang=pt

EUROSTAT. **Agriculture, forestry and fishery statistics - milk and milk products statistics, December 2020.** Luxembourg.

FAJARDO-ESPINOZA, Fernanda S.; ORDAZ-PICHARDO, Cynthia; SANKAR, Uma; ROMERO-ROJAS, Andrés; MORENO-EUTIMIO, Mario A.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Humberto. In vitro cytomodulatory and immunomodulatory effects of bovine colostrum whey protein hydrolysates. **International Journal of Food Science & Technology**, *[S. l.]*, v. 56, n. 5, p. 2109–2121, 2021. DOI: 10.1111/ijfs.14767. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.14767.

FENG, Chunsong; TIAN, Li; HONG, Hui; WANG, Quanyu; ZHAN, Xin; LUO, Yongkang; TAN, Yuqing. In Vitro Gut Fermentation of Whey Protein Hydrolysate: An Evaluation of Its Potential Modulation on Infant Gut Microbiome. **Nutrients**, *[S. l.]*, v. 14, n. 7, p. 1374, 2022. DOI: 10.3390/nu14071374. Disponível em: https://www.mdpi.com/2072-6643/14/7/1374.

FERREIRA, Kueirislene Maria et al. Epilepsy & Behavior Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish. *[S. l.]*, v. 117, 2021. DOI: 10.1016/j.yebeh.2021.107881. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525505021001153

FLORENTINO, Gabrielle Ingrid Bizerra; LIMA, Darlinne Amanda Soares; SANTOS, Miriane Moreira Fernandes; FERREIRA, Valquíria Cardoso da Silva; GRISI, Cristiani Viegas Brandão; MADRUGA, Marta Suely; DA SILVA, Fábio Anderson Pereira. Characterization of a new food packaging material based on fish by-product proteins and passion fruit pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, *[S. l.]*, v. 33, n. February, 2022. DOI: 10.1016/j.fpsl.2022.100920. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289422001120

GALLO, Valentina; GIANSANTI, Francesco; ARIENZO, Alyexandra; ANTONINI, Giovanni. Antiviral properties of whey proteins and their activity against SARS-CoV-2

infection. **Journal of Functional Foods**, *[S. l.]*, v. 89, p. 104932, 2022. DOI: 10.1016/j.jff.2022.104932. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464622000020.

GEBAUER, Daiane L.; PAGNUSSAT, Natália; PIATO, Ângelo L.; SCHAEFER, Isabel C.; BONAN, Carla D.; LARA, Diogo R. Pharmacology , Biochemistry and Behavior Effects of anxiolytics in zebra fi sh : Similarities and differences between benzodiazepines , buspirone and ethanol ☆. *[S. l.]*, v. 99, p. 480–486, 2011. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.04.021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305711001316

GIROLDI, Maiara; GRAMBUSCH, Isabel Marie; SCHLABITZ, Cláudia; KUHN, Daniel; LEHN, Daniel Neutzling; VOLKEN DE SOUZA, Claucia Fernanda. Encapsulation of protein hydrolysates by spray drying: feasibility of using buffalo whey proteins. **International Journal of Food Science & Technology**, *[S. l.]*, v. 57, n. 6, p. 3419–3427, 2022. DOI: 10.1111/ijfs.15665. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.15665.

GOMES, Antoniel A. S.; CARDOSO, Fabio F.; SOUZA, Maximilia F.; OLIVEIRA, Cristiano L. P.; PERAHIA, David; MAGRO, Angelo J.; FONTES, Marcos R. M. The allosteric activation mechanism of a phospholipase A2-like toxin from Bothrops jararacussu venom: a dynamic description. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 10, n. 1, p. 16252, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-73134-9. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-020-73134-9.

GRABNER, Amy N. et al. BmajPLA 2 -II, a basic Lys49-phospholipase A 2 homologue from Bothrops marajoensis snake venom with parasiticidal potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 102, p. 571–581, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016306778.

GUPTA, Sudheer; KAPOOR, Pallavi; CHAUDHARY, Kumardeep; GAUTAM, Ankur; KUMAR, Rahul; RAGHAVA, Gajendra P. S. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 8, n. 9, p. e73957, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0073957. Disponível em: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073957.

HINTOIU, A.; RAPEANU, G.; STANCIU, S.; STANCIUC, N. The effect of pH and thermal treatment on some functional properties of whey proteins hydrolysates as measured by fluorescence spectroscopy. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, *[S. l.]*, v. 17, n. 2, p. 179–185, 2011. Disponível em: http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ffh&AN=2012-04-Pn0707&lang=pt-br&site=ehost-live&authtype=ip,cookie,uid.

HOSSEINI, Seyed Fakhreddin; RAMEZANZADE, Leila; MCCLEMENTS, David Julian.

Recent advances in nanoencapsulation of hydrophobic marine bioactives: Bioavailability, safety, and sensory attributes of nano-fortified functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, *[S. l.]*, v. 109, p. 322–339, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.01.045. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421000455.

JAMBRAK, Anet Režek; MASON, Timothy J.; LELAS, Vesna; PANIWNYK, Larysa; HERCEG, Zoran. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, *[S. l.]*, v. 121, p. 15–23, 2014. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.08.012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413004160.

KOIRALA, Sushil; PRATHUMPAI, Wai; ANAL, Anil Kumar. Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. **International Dairy Journal**, *[S. l.]*, v. 118, p. 105026, 2021. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.105026. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694621000546.

KRUNIĆ, Tanja Ž.; RAKIN, Marica B. Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: Impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages. **Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 370, p. 130931, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130931. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621019373.

LAKOWICZ, Joseph R. Protein Fluorescence. *In*: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 1983. p. 341–381. DOI: 10.1007/978-1-4615-7658-7_11. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-7658-7_11.

LAVELLI, Vera; BECCALLI, Matteo Paolo. Cheese whey recycling in the perspective of the circular economy: Modeling processes and the supply chain to design the involvement of the small and medium enterprises. **Trends in Food Science & Technology**, *[S. l.]*, v. 126, p. 86–98, 2022. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.06.013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224422002060.

LEÓN-LÓPEZ, Arely; PÉREZ-MARROQUÍN, Xóchitl Alejandra; ESTRADA-FERNÁNDEZ, Ana Guadalupe; CAMPOS-LOZADA, Gieraldin; MORALES-PEÑALOZA, Alejandro; CAMPOS-MONTIEL, Rafael G.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, Gabriel. Milk Whey Hydrolysates as High Value-Added Natural Polymers: Functional Properties and Applications. **Polymers**, *[S. l.]*, v. 14, n. 6, 2022. DOI: 10.3390/polym14061258. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4360/14/6/1258

LI, X. Y.; CHENG, M.; LI, J.; ZHAO, X.; QIN, Y. S.; CHEN, D.; WANG, J. M.; WANG, C. F. Change in the structural and functional properties of goat milk protein due to pH and heat.

[S. l.], p. 1337–1351, 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-16862. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219310495

LIE, S. THE EBC-NINHYDRIN METHOD FOR DETERMINATION OF FREE ALPHA AMINO NITROGEN. **Journal of the Institute of Brewing**, *[S. l.]*, v. 79, n. 1, p. 37–41, 1973. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x.

LOPES NETO, J. H. P. et al. Development and characterization of Lactobacillus acidophilus (LA-3) microparticles with reducing substances and its addition to Reino cheese. **LWT**, *[S. l.]*, v. 143, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111083. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382100236X

MA, Jing-Jiao; MAO, Xue-Ying; WANG, Qian; YANG, Shu; ZHANG, Dan; CHEN, Shang-Wu; LI, Ying-Hui. Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. **LWT - Food Science and Technology**, *[S. l.]*, v. 56, n. 2, p. 296–302, 2014. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813004908.

MAGRO, Angelo; SILVA, Martin; SOUSA, Guilherme; CARDOSO, Fábio; GUIMARÃES, Gabriel; MUNIZ, Sérgio; SARNIGHAUSEN, Valéria; FONTES, Marcos; SIMÕES, Rafael. Development of a low-cost colorimeter-like for undergraduate classes using microcontroller board and RGB LED. **Educación Química**, *[S. l.]*, v. 31, n. 1, p. 36, 2020. DOI: 10.22201/fq.18708404e.2020.1.68349. Disponível em: http://www.revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/68349.

MARKET UPDATES. **Goat Milk Market Size 2023 With Over-All Dominated, Share Of Everywhere, Ease Of Access Of Solutions**. USA.

MARTINI, S.; POTTER, R.; WALSH, M. K. Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. **Food Research International**, *[S. l.]*, v. 43, n. 10, p. 2444–2451, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.09.018. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910003261.

MEDEIROS, Gracy K. V. V. et al. Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 113, p. 116–123, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.200. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471095/

MILES, Andrew J.; RAMALLI, Sergio G.; WALLACE, B. A. <scp>DichroWeb</scp> , a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic

data. **Protein Science**, *[S. l.]*, v. 31, n. 1, p. 37–46, 2022. DOI: 10.1002/pro.4153. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.4153.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, *[S. l.]*, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014. DOI: 10.1039/C3FO60702J. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=C3FO60702J.

MINKIEWICZ; IWANIAK; DAREWICZ. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, *[S. l.]*, v. 20, n. 23, p. 5978, 2019. DOI: 10.3390/ijms20235978. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/20/23/5978.

MOONEY, Catherine; HASLAM, Niall J.; POLLASTRI, Gianluca; SHIELDS, Denis C. Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 7, n. 10, p. e45012, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0045012. Disponível em: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045012.

MORALES, Francisco J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, Salvio. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 72, n. 1, p. 119–125, 2001. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00239-9. Disponível em:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600002399

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; BUREN, J. P. VAN; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, *[S. l.]*, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, 1985. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x.

MUDGIL, Priti; ALMAZROUI, May; REDHA, Ali Ali; KILARI, Bhanu Priya; SRIKUMAR, Shabarinath; MAQSOOD, Sajid. Cow and camel milk-derived whey and casein protein hydrolysates demonstrated effective antifungal properties against selected Candida species. **Journal of Dairy Science**, *[S. l.]*, v. 105, n. 3, p. 1878–1888, 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-20944. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030221010717.

OECD. Fish, acute toxicity test. *In*: **Guideline for the Testing of Chemicals**. [s.l: s.n.]. p. 1–9.

OSTERTAG, Fabian; SCHMIDT, Christian M.; BERENSMEIER, Sonja; HINRICHS, Jörg. Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins. **Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 342, p. 128176,

2021. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.128176. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33046286/

OYAIZU, Makoto. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, *[S. l.]*, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986. DOI: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307. Disponível em: http://www.jstage.jst.go.jp/article/eiyogakuzashi1941/44/6/44_6_307/_article/-char/ja/.

PEARCE, Kevin N.; KINSELLA, John E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978. DOI: 10.1021/jf60217a041. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60217a041.

PEDROSO, Amanda P. et al. Intrauterine Growth Restriction Programs the Hypothalamus of Adult Male Rats: Integrated Analysis of Proteomic and Metabolomic Data. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 16, n. 4, p. 1515–1525, 2017. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00923. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.6b00923.

POLOWSKY, P.; COUDÉ, B.; JIMÉNEZ-MAROTO, L.A.; JOHNSON, M.; PARK, Y. W. Flavor and Sensory Characteristics of Non-Bovine Species Milk and Their Dairy Products. *In*: JOHNWILEY & SONS, Ltd. .. Hoboken (org.). **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**. NJ, USA. p. 595–623.

RUFINO, Maria do Socorro Moura; ALVES, Ricardo Elesbão; BRITO, Edy Sousa De; MORAIS, Selene Maia De; SAMPAIO, Caroline de Goes; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio Diego. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico, 125 Embrapa**, *[S. l.]*, p. 3–6, 2006. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/664098/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pelo-metodo-de-reducao-do-ferro-frap

RUFINO, Maria do Socorro Moura; ALVES, Ricardo Elesbão; BRITO, Edy Sousa De; MORAIS, Selene Maia De; SAMPAIO, Caroline de Goes; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio Diego. Embrapa - Cot_127. **Embrapa**, *[S. l.]*, p. 1–4, 2007. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf.

RUKLUARH, Sureerat; KANJANAPONGKUL, Kobsak; PANCHAN, Noppadol; NIUMNUY, Chalida. Journal of Food Science and Agricultural Technology Effect of inclusion conditions on characteristics of spray dried whey protein hydrolysate/γ-cyclodextrin complexes. **Journal of Food Science and Agricultural Technology**, *[S. l.]*, v. 5, p. 5–12, 2019. Disponível em: http://rs.mfu.ac.th/ojs/index.php/jfat.

SARABANDI, Khashayar; GHAREHBEGLOU, Pouria; JAFARI, Seid Mahdi. Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. **Drying Technology**, *[S. l.]*, v. 38, n. 5–6, p. 577–595, 2020. DOI: 10.1080/07373937.2019.1689399. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07373937.2019.1689399.

SARABANDI, Khashayar; MAHOONAK, Alireaza Sadeghi; HAMISHEHKAR, Hamed; GHORBANI, Mohammad; JAFARI, Seid Mahdi. Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. **Journal of Food Engineering**, *[S. l.]*, v. 251, p. 19–28, 2019. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877419300500.

SCHÄGGER, Hermann; VON JAGOW, Gebhard. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269787905872.

SIEBEL, Anna Maria; MENEZES, Fabiano Peres; CAPIOTTI, Katiucia Marques; KIST, Luiza Wilges; SCHAEFER, Isabel da Costa; FRANTZ, Juliana Zanetti; BOGO, Maurício Reis; DA SILVA, Rosane Souza; BONAN, Carla Denise. Role of Adenosine Signaling on Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Zebrafish. **Zebrafish**, *[S. l.]*, v. 12, n. 2, p. 127–136, 2015. DOI: 10.1089/zeb.2014.1004. Disponível em: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/zeb.2014.1004.

SILVESTRE, Marialice Pinto Coelho; MORAIS, Harriman Aley; SILVA, Viviane Dias Medeiros; SILVA, Mauro Ramalho. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. **Nutrire**, *[S. l.]*, v. 38, n. 3, p. 278–290, 2013. DOI: 10.4322/nutrire.2013.026. Disponível em: http://www.sban.org.br/revista_acervo/40/acervo.

SINGEWALD, Nicolas; SARTORI, Simone B.; REIF, Andreas; HOLMES, Andrew. Alleviating anxiety and taming trauma: Novel pharmacotherapeutics for anxiety disorders and posttraumatic stress disorder. **Neuropharmacology**, *[S. l.]*, v. 226, p. 109418, 2023. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2023.109418. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390823000084.

SINGH, Brij Pal; ALUKO, Rotimi E.; HATI, Subrota; SOLANKI, Divyang. Bioactive peptides in the management of lifestyle-related diseases: Current trends and future perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, *[S. l.]*, v. 62, n. 17, p. 4593–4606, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2021.1877109. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2021.1877109.

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**, *[S. l.]*, v. 13, n. 6, p. 447–453, 2003. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00053-0. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603000530.

TOMÉ, Alessandra Cristina; DA SILVA, Flávio Alves. Alginate based encapsulation as a tool for the protection of bioactive compounds from aromatic herbs. **Food Hydrocolloids for Health**, *[S. l.]*, v. 2, p. 100051, 2022. DOI: 10.1016/j.fhfh.2021.100051. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2667025921000431.

TONDO, Anna Rita; CAPUTO, Leonardo; MANGIATORDI, Giuseppe Felice; MONACI, Linda; LENTINI, Giovanni; LOGRIECO, Antonio Francesco; MONTARULI, Michele; NICOLOTTI, Orazio; QUINTIERI, Laura. Structure-Based Identification and Design of Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Whey Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 68, n. 2, p. 541–548, 2020. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b06237. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b06237.

TSERMOULA, Paraskevi; KHAKIMOV, Bekzod; NIELSEN, Jacob Holm; ENGELSEN, Søren Balling. WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. **Trends in Food Science & Technology**, *[S. l.]*, v. 118, p. 230–241, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.08.025. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421005124.

TU, Maolin; WANG, Cong; CHEN, Cheng; ZHANG, Ruyi; LIU, Hanxiong; LU, Weihong; JIANG, Lianzhou; DU, Ming. Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. **Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 256, p. 98–104, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.02.107. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618303455.

ULUG, Sule Keskin; JAHANDIDEH, Forough; WU, Jianping. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, *[S. l.]*, v. 108, p. 27–39, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.002. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224420307147

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados no formato de artigos, seguindo o recomendado pelas normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. (Norma Complementar nº 56/2014).

4.1 ARTIGO 1

O seguinte artigo foi submetido a publicação no periódico *International Journal of Biological Macromolecules*, fator de impacto: 8,025, Qualis Capes para Ciências dos Alimentos: A1

Peptídeos obtidos do soro do leite caprino com potencial biológico, otimização por rsm, avaliação das características e ensaios in sílico, in vitro e in vivo utilizando um modelo Zebrafish (Danio rerio)

Maria Isabel Ferreira Campos [a*], Ana Karolina de Sousa Lima [a], José Honório Pereira Lopes Neto [a], Júlia Mariano Caju [a]; Antonio Wlisses da Silva [b], Maria Kueirislene Amâncio Ferreira[b], Jackson Gabriel Miyamoto [c], Carlos Alberto de Almeida Gadelha [e], Hélcio Silva dos Santos [b], Emmanuel Silva Marinho [b], Alexandre Keiji Tashima [d], Tatiane Santi Gadelha [e] *

[a] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil

[b] Centro de Ciências e Tecnologia, Grupo de Pesquisa em Química de Produtos Naturais e Sintéticos e Bioensaios com Zebrafish, Universidade Estadual do Ceará, CE, Brasil

[c] Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil

[d] Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil

[e] Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil

*Autores correspondentes.

Endereço de e-mail: belcampos.va@gmail.com (Maria isabel Ferreira Campos)
santi.tatiane@gmail.com (Tatiane Santi Gadelha)

ABSTRACT

As protéinas do soro do leite caprino podem ser utilizadas como substrato enzimático para obtenção de peptídeos bioativos que apresentam propriedades biológicas de grande interesse, dessa forma o objetivo desse estudo foi hidrolisar as proteínas do soro do leite caprino com pepsina utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 e avaliar as propriedades biológicas (antioxidante e ensaio comportamental com zebrafish), tecnológicas (solubilidade, hidrofobicidade) e estruturais (perfil peptídico por eletroforese, LC-MS, fluorescência intrínseca). O tempo foi a variável mais influente no processo onde 150 min no pH 2,2 foi a condição ideal para a melhor solubilidade, maior liberação de aminoácidos livres, maior potencial antioxidante e melhor hidrólise da beta-lactoglobulina, uma proteína teoricamente mais difícil de quebrar. A predição da bioatividade revelou a obtenção de sequencias com efeitos antidiabéticos, hipotensores, antioxidantes, opióides e com ação no sistema neurológico sendo observado um efeito ansiolítico nos peixes zebra que foram administrados com o hisrolisado proteico do soro do leite caprino. Estes resultados evidenciam o potencial bioativo dos hidrolisados proteicos do soro do leite caprino, mostrando que este pode ser um processo aprimorado a partir de modificações nas condições da reação que

melhoram a obtenção de peptídeos bioativos os quais podem ser inseridos no contexto de utilização como um ingrediente alimentar e/ou nutracêutico.

Proteínas do soro; leite caprino; hidrolisados proteicos; peptídeos bioativos; atividade biológica; Zebrafish;

HIGHLIGHTS

- Um hidrolisado rico em peptídeos bioativos foi obtido a partir das proteínas do soro do leite caprino e estes foram identificados por LC/MS
- A pepsina foi capaz de hidrolisar a β-lactoglobulina em pH 2,25 e 150 min
- 4 peptídeos bioativos foram identificados KALPMHIRL, DTDYKKYLL, AFNPTQL, PMHIRL, DTDYKKYLLF
- Um modelo in vivo utilizando Zebrafish foi capaz de avaliar a atividade ansiolítica do hidrolisado do soro do leite caprino

1. INTRODUÇÃO

Um dos impactos da pandemia de covid-19 foi a mudança na percepção da população do cuidado com a saúde e como consequência, os consumidores passaram a ter maior atenção com a qualidade da alimentação optando pelo consumo de alimentos que possam promover um bom estado de saúde. Dentre os nutrientes, as proteínas são macromoléculas biológicas que podem ser exploradas para obtenção de bioativos com efeitos fisiológicos importantes para a saúde [1].

O leite caprino é um alimento rico em proteínas que se destaca como uma alternativa ao consumo do leite de vaca por apresentar melhor digestibilidade e menor alergenicidade, este pode ser consumido tanto na sua forma *in natura* ou através de produtos derivados, como queijos, iogurtes, bebidas entre outros. [1–4]. Durante a produção de queijos há a formação de um grande volume de resíduo, o soro do leite, o qual por muitos anos foi considerado um poluente, sem valor nutricional ou de comercialização. Contudo atualmente este é considerado como o subproduto da indústria láctea que apresenta maior prospecção de mercado com potencial de utilização em diferentes produtos [1,5].

A composição proteica do soro do leite caprino se diferencia quanto a quantidade e propriedades físicas e químicas. Estão presentes no soro do leite caprino a β-lactoglobulina (β-lg), α-lactalbumina (α-la), albumina de soro, em menor concentração há a presença de imunoglobulinas, sistemas enzimáticos como a lactoperoxidase e proteínas como a lactoferrina, κ-caseína entre outras [6].

A utilização de proteases pela indústria de alimentos é um método seguro, de fácil controle, que mantém o valor nutricional. Este processo pode ser planejado levando em consideração alguns fatores fundamentais (pH, enzima, tempo, temperatura etc) possibilitando uma melhor obtenção de sequências bioativas e ocasionando em diminuição da alergenicidade e melhor digestibilidade das proteínas [7–10].

Hidrolisados do soro do leite vem sendo reportados na literatura por possuírem diferentes tipos de bioatividades tais como, efeitos a nível celular conferindo atividade citoprotetiva, antitumoral, imunomodulatória e antioxidante [11,12]. Inibição do crescimento de microrganismos como vírus, fungos e bactérias [13–15]. Podem também atuar na regulação e/ou inibição do funcionamento de enzimas como a dipeptidil peptidase 4 (DPP IV), α-glucosidase, α-amilase e enzima conversora de angiotensina (ECA) resultando em efeitos

hipoglicêmicos e hipotensores [7,16]. Estudos recentes também apontam seu potencial como neuropeptídeos em decorrência dos seus efeitos opióides, probióticos e prébioticos [17,18].

Desordens emocionais como a ansiedade e depressão são problemas de saúde que afetam grande parte da população mundial e movimentam um mercado bilionário de drogas ansioliticas. A ocorrência destas é multifatorial e engloba diferentes tipos de mecanismos de ação, respostas somáticas, emocionais e comportamentais. Logo, a utilização de um subproduto barato e obtido em grandes volumes para a obtenção de peptídeos bioativos com efeitos ansiolíticos estimula o fomento a economia do mercado de leite caprino representa também uma nova ferramenta natural para o gerenciamento dessa desordem [19–21].

Para tanto, o uso de modelos animais demonstra ser uma importante ferramenta para mensurar o possível efeito ansiolítico de peptídeos em parâmetros comportamentais e de ansiedade [19]. Nesse sentido, o uso do Zebrafish (*Danio rerio*) se destaca por ser um modelo animal de pequeno porte, alta proliferação, fácil manuseio e baixo custo, que possui um genótipo com 70% de homologia exclusiva com receptores de neurotransmissores de mamíferos [20,22].

Assim o objetivo do presente trabalho é produzir peptídeos bioativos a partir da hidrólise das proteínas do soro do leite caprino utilizando uma protease comercial de baixo custo e avaliar o comportamento dos hidrolisados utilizando diferentes ferramentas e modelos (*in vivo*, *in vitro* e in sílico) contribuindo para o entendimento da estrutura, das suas propriedades tecnológicas e bioativas e colaborando para que estes possam se tornar uma intervenção nutricional útil no futuro para diversos segmentos da indústria [23,24].

2. MATERIAL E MÉTODOS.

2.1. Material

O leite caprino foi cedido pelo setor de caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A pepsina (800-1000 U/mg proteína) foi adquirida da Sigma e Aldrich (St. Louis, MO, USA). As membranas de ultrafiltração foram obtidas da Spectrum™ Labs Spectra/Por™ Dry Dialysis Kits com 34 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento. O sistema de eletroforese utilizado foi da marca Loccus. O marcador de peso molecular da GE Healthcare Life Sciences, (Nova Jersey, USA). Dimetilsulfóxido (3% DMSO) adquirido da Dynamic®. Os reagentes 2,2-difenil-1-picrilhidrazil – (DPPH), 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (FRAP), 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), ortho-phthalaldehyde (OPA), Pentilenetetrazol (PTZ), os padrões serina, e albumina sérica bovina foram adquiridos naSigma e Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diazepam (DZP) da Neo Química e Flumazenil (Fmz) da Sandoz foram adquiridos em farmácias fornecidos pela Neo , respectivamente. Os outros reagentes e soluções utilizados foram de grau analítico.

2.2. Elaboração e caracterização do soro do leite caprino

O leite caprino foi desnatado em desnatadeira do tipo industrial (Capacidade para 50 L, modelo aberta 480 West). Em seguida foi submetido a precipitação ácida para obtenção das proteínas do soro de acordo com o protocolo estabelecido anteriormente pelo nosso grupo [6]. O soro do leite foi avaliado quanto a umidade (método gravimétrico por secagem em forno a 105°C – Protocolo 990,20), extrato seco total, cinzas (incineração em mufla a 550ºC, Protocolo 968.08), lipídeos (método de Gerber- Protocolo 2000.18), teor de atividade de água (Usando analisador Aqualab) [25], lactose, proteínas totais utilizando o fator de conversão do nitrogênio

de 6,38 (Kjeldahl, 991.20) e dosagem de proteínas solúveis pelo método descrito por Bradford [26].

2.3. Ultrafiltração do soro do leite caprino

O soro foi ultrafiltrado usando membranas com 4 diferentes cortes moleculares (MW), 8 kDa, 3 kDa, 1 kDa e 500 Da para melhor concentração de suas proteínas. Assim com base no peso molecular foram obtidas 4 frações do soro do leite concentrado que foram secadas por liofilização e testadas quanto ao teor de proteínas, a fração que retornou melhor resultado foi utilizada para a condução dos experimentos subsequentes [27].

2.4. Planejamento experimental da hidrólise enzimática e análise da superfície de resposta

A análise da superfície de resposta foi utilizada para a avaliação da hidrólise do soro do leite caprino utilizando a enzima pepsina. Para tal, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 incluindo quatro ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. Foram testadas duas variáveis independentes: tempo de hidrólise T (X1) e pH (X2) e a função resposta foi o % de grau de hidrólise (% GH) [28].

Para identificar relações entre as variáveis de resposta e os parâmetros do processo a equação do modelo utilizada foi expressa por:

$$Y=\beta\ 0+\beta\ 1\ X1+\ \beta\ 2\ X2\ +\ \beta\ 3.X1X2+\ \beta\ 4.X12+\ \beta\ 5.X22 \qquad \text{(Eq 1)}$$

O modelo ajustado aos dados experimentais foi avaliado pela análise de variância (ANOVA). A aptidão dos modelos polinomiais foi estimada por meio do coeficiente de determinação (R2) e do teste de falta de ajuste (TFA). A superfície de resposta foi construída usando o software STATISTICA 5.0 (Statsoft Inc. Corporativo Tulsa, OK, EU) e a resposta quadrática R^2 foi baseada em regressões lineares múltiplas considerando os efeitos principal, quadrático e de interação. Para evitar erros, todos os experimentos foram realizados em triplicata e aleatoriamente. As réplicas do ponto central foram feitas para permitir a estimativa do erro puro.

Variáveis independentes	**Níveis reais e codificados**				
	-α	-1	0	+1	+α
Tempo (min)	107,0	120	150	180	193,0
pH	1,2	1,4	2,2	3,0	3,2

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

Ensaio	Variáveis independentes		Variável Resposta
	Tempo (min)	pH	Grau de hidrólise (%)
1	(-1) 120	(-1) 1,40	10,29
2	(+1) 180	(-1) 1,40	11,08
3	(-1) 120	(+1) 3,00	16,59
4	(+1) 180	(+1) 3,00	17,46
5	(0) 150	(-α 1,41) 1,20	14,05
6	(0) 150	(+α 1,41) 3,20	20,50
7	(-α 1,41) 107	(0) 2,25	8,98
8	(+α 1,41) 192	(0) 2,25	22,74
9	(0) 150	(0) 2,25	37,68
10	(0) 150	(0) 2,25	37,56
11	(0) 150	(0) 2,25	37,62

Tabela 2. Planejamento experimental do tipo DCCR 2^2 com três repetições no ponto central

2.5. Preparo dos hidrolisados proteicos do soro do leite caprino

A hidrólise enzimática do soro caprino foi realizada a partir de modificações das metodologias definidas por Ahmed et al. (2015) e Tondo et al. (2020) nas condições de pH 2,25 e variando o tempo de reação (107, 150 e 192 min), assim os tratamentos foram denominados como soro do leite hidrolisado no tempo 1 – WPH T1, soro do leite hidrolisado tempo 2 – WPH T2 e soro do leite hidrolisado tempo 3 – WPH T3 . Para a hidrólise uma solução a 6% (p/v) de soro foi preparada em tampão fosfato pH 2,2, 0,1 mol L^{-1} deixada sob agitação leve por 1 h para completa solubilização. Para cada experimento se manteve a razão de enzima substrato (1:50) e a temperatura de 37 ºC mantidos em estufa incubadora shaker de bancada, com agitação de 180 rpm/min. A inativação da enzima foi realizada em banho-maria 85 ºC por 5 min, em seguida as amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min e 4 ºC. Por fim, o sobrenadante foi recolhido e dialisado em membranas de 1 kDa, congelado e liofilizado.

2.6. Caracterização dos hidrolisados do soro do leite caprino

2.6.1. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado a partir da metodologia do OPA (o-ftaldialdeído) descrito por Silvestre e por Spellman [41,42]. 100 µL de amostra (1mg.mL) foram adicionados a 750 µL do reagente OPA e após 2 min a leitura da abs foi realizada no comprimento de onda de 340 nm. O cálculo do GH foi realizado através da equação 2.

$$GH\ (\%) = (\Delta\ Abs \times 1{,}934d)/c \qquad \text{(Eq 2)}$$

Onde:

Δ Abs é o valor da absorbância da amostra teste subtraído do valor da absorbância da amostra não hidrolisada. O valor fixo de 1,934 é relativo ao valor da massa molecular para as proteínas do soro do leite que é de 23644 Da
d é o fator de diluição
c o valor obtido de proteína total pelo método de Kjeldahl.

2.6.2. Determinação de aminoácidos livres e mudanças na turbidez em função do GH

O teor de aminoácidos livres foi mensurado pelo do método da ninidrina usando glicina como padrão [33]. Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL das amostras (1 mg.mL) e 1 mL do reagente de ninidrina e aquecidos em banho-maria a 85 ºC por 15 min. Após o resfriamento foi adicionado 5 mL da solução de diluição (KI 0,2 % e etanol 40%) e misturou-se em vortex por 10 s. A absorbância (abs) foi lida em um comprimento de onda de 570 nm. Os valores obtidos foram convertidos em aminoácidos livres a partir da equação 3. O resultado foi expresso como alfaaminonitrogênio livre – Fan: 200 mg.L

$$Fan = (A1/A2) \times 1 \times F \qquad \text{(Eq 3)}$$

Onde, A1 corresponde a absorbância da amostra, A2 é referente a absorbância do padrão glicina, F é relativo ao fator de diluição da amostra.

Para determinação da turbidez as amostras foram solubilizadas em água ultrapura (1% p/v) e mantidas sob agitação leve por 2 horas a 25 °C, então a absorbância foi medida a 600 nm [34].

2.6.3. Quantificação de proteínas solúveis

O conteúdo de proteína solúvel dos hidrolisados foi avaliado de acordo com a metodologia de Bradford onde os hidrolisados foram adicionados a ácido tricloroacético (0.22 M 1:1 v/v) e incubados por 15 min a 4 °C. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 1080 x g por 10 min e após 10 min a abs do sobrenadante foi lida a 595 nm [26,35].

2.6.4. Avaliação da solubilidade

A solubilidade dos hidrolisados proteicos foi realizada a partir da metodologia de Morr [46] com modificações. As amostras foram diluídas em água ultrapura (5 mg.mL) e o pH ajustado para os valores 3, 5 e 7. Em seguida as soluções foram agitadas por 45 minutos em agitador magnético e centrifugadas a 1080 x g por 30 min e 4º C. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor de proteínas solúveis pelo método de Bradford [26].

2.6.5. Perfil peptídico por SDS-PAGE Tris-tricina

Os peptídeos de baixo peso molecular obtidos por hidrólise foi verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Tricina (SDS-PAGE Tris-Tricina), de acordo com o método de Schägger & von Jagow [37]. Os géis utilizados para performar a corrida eletroforética possuem 3 diferentes concentrações de acrilamida: gel de separação (16% T e 3% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C). Ao término das corridas os géis foram fixados em solução fixadora (Metanol 40% e ácido acético 10%), corados em solução de Coomassie brilliant Blue G250 (0,025% de Comassie Blue em 10% ácido acético), durante 48 horas e posteriormente descorados em solução descorante (àcido acético 10%). Marcadores de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, USA)

foram utilizados como padrão para comparar com as proteínas do soro do leite caprino e a obtenção de frações de menor tamanho obtidas pela hidrólise.

2.6.6. Espectroscopia de fluorescência intrínseca

As medições de fluorescência nas amostras foram feitas em espectrofluorímetro usando comprimento de onda de excitação de 292 nm e de emissão coletado entre 300 e 420 nm. A fendas de excitação e de emissão foram de 10 nm, e a velocidade da varredura de 200 nm min^{-1}. As medições do espectro de fluorescência foram feitas a 25 °C e expressadas em unidades arbitrárias u.a., com base na metodologia descrita por Hînţoiu, A. et al. [38]. As amostras foram diluídas em água ultrapura na concentração de 0,25 $mg.mL^{-1}$ seguindo o descrito por Cui et al. [39]e as leituras foram realizadas em triplicata.

2.6.7. Análise de cromatografia liquida de alta performance em fase reversa

As características polares e apolares das amostras de soro do leite caprino e dos hidrolisados foram avaliadas a través de Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (HPLC) [40,41]. As amostras foram diluídas em água ultrapura (5 mg.mL) e 20µL foi injetado em uma coluna tipo C18. As soluções utilizadas para a fase móvel foram Eluente A (Ácido trifluoroacético a 1% em água ultrapura) e Eluente B (Ácido trifluoroacético a 1% em Acetonitrila) com gradiente linear de 5 a 100% de A para B, em fluxo de 1mL.min com duração da corrida de 100 min, por fim as detecções foram realizadas a 218 nm.

2.7. Estimativa do potencial antioxidante

2.8. Ensaio de descoloração ABTS

Foi preparada uma solução de ABTS (7mM) e persulfato de potássio (2.45 mM) que foi deixada no escuro e em temperatura ± 25º C por 12-16 h antes de ser utilizada. A solução de ABTS foi diluída em etanol 95% até obter uma absorbância de 0,70 ± 0.02 a 734 nm. Então, 15 µL de cada amostra (10 mg.mL) foi misturado com 1,5 mL da solução de $ABTS^{+}$, a mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 s e deixada no escuro por 6 min. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.) em 734 nm. Os resultados foram expressos em % de inibição do radical levando em consideração uma curva padrão de Trolox (100 µM – 2000 µM) [42].

2.9. Atividade sequestradora de radicais DPPH

A atividade antioxidante utilizando o radical DPPH foi avaliada de acordo com a metodologia de Morales & Jiménez-Pérez (Morales; Jiménez-Pérez, 2001) com algumas modificações, 1.950 µL da solução de DPPH 0,06 mM (solubilizada em metanol) foi misturada com 50µL de cada amostra (10 mg.mL) e mantidas sob agitação por 30 min em ambiente escuro. Após esse tempo a absorbância foi medida a 517 nm contra um branco de metanol Os resultados foram expressos como descritos no item anterior.

2.10. Identificação dos peptídeos do hidrolisado proteico por espectrometria de massas LC/MS

2.10.1. Dessalinização, limpeza de amostras e quantificação dos peptídeos

As amostras foram submetidas à extração em fase sólida com colunas-C18 do tipo Stage Tips e eluídas com 40% de acetonitrila. As StageTips foram montadas com uma resina do tipo InertSep RP-C18 (GL Sciences) e membrana SDB-XC (Empore, 3M) dentro de pontas de pipeta P200 [44]. Os materiais eluidos foram secos em concentrador a vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf) e armazenados a -20 °C até a análise de MS. Os peptídeos foram quantificados medindo-se a absorbância em 480 nm (Synergy HT - Bio Tek) em placas de 96 poços, utilizando-se PierceTM Colorimetric Peptide Assay (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

2.10.2. Aquisição de espectrometria de massa (LC-MS/MS)

As análises LC-MS/MS foram realizadas no sistema cromatográfico nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a espectrômetro de massa Synapt G2 HDMS (Waters). Amostras (5 µg) foram carregadas em uma coluna Trap (Acquity UPLC M-Class Symmetry C18, 100 Å, 5 µm, 300 µm x 25 mm, Waters) a 8 $\mu L.min^{-1}$ de 5% de acetonitrila e 0,1% ácido fórmico em água por 5 min. Em seguida, a mistura de peptídeos aprisionados foi eluída em coluna analítica (Coluna Acquity UPLC M-Class HSS T3, 1,8 µm, 300 µm x 150 mm, Waters) com gradiente de 5-35% da fase B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), fase A (0,1% de ácido fórmico em água), ao longo de 30 min a uma vazão de 3 $\mu L.min^{-1}$. Os dados MS foram adquiridos no modo independente de dados MSE, na faixa m/z de 50-2000 e configurados no modo resolução. Os íons peptídicos foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), na qual as energias de colisão foram alternadas entre baixa (4 eV) e alta (rampada de 23 a 58 eV) para íons precursores e íons fragmentos, respectivamente, usando o tempo de varredura de 1,0 s. A fonte ESI foi operada no modo positivo com voltagem capilar de 2,7 kV, temperatura do bloco de 100 °C e voltagem do cone de 40 V. A temperatura da coluna foi ajustada em 55 °C e as amostras foram mantidas em autosampler a 10 °C. Para correção de massa de bloqueio, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 $fmol.mL^{-1}$ em 50% de metanol, 0,1% de ácido fórmico; Peptídeo 2,0) foi infundida através do pulverizador de referência a 2 $\mu L.min^{-1}$ e amostrada a cada 60 s para calibração externa (Pedroso et al., 2017).

2.10.3. Processamento de dados e identificação de proteínas

As listas de picos de espectros MS/MS foram geradas no software ProteinLynx Global Server 3.0.3 (Waters) como arquivos .mzML e processadas pelo módulo Apex3D usando limite de baixa energia de 750 contagens e limite de alta energia de 50 contagens [45]. Em seguida, carregados no Peaks Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc.) e pesquisados no banco de dados Capra Hircus (Uniprot 146 entradas, data: 25 de dezembro de 2021). Os parâmetros de pesquisa foram definidos da seguinte forma: tolerância de massa de 10 ppm para íons precursores e 0,025 Da para íons fragmentos, De novo (ALC ≥ 50%), -10 LogP ≥ 50 no nível de peptídeo e ≥ 20 no nível de proteína, com mínimo de 1 peptídeo único. Acetilação N-terminal e oxidação de metionina foram definidas como modificações variáveis. Pepsina: local de clivagem estabelecido após Phe, Leu, Tyr, Trp; máx. 5 clivagens perdidas, clivagens não específicas em ambos os lados.

2.11. Análises *in sílico*

A predição da bioatividade foi feita a partir do servidor PeptideRanker que se baseia em uma nova rede neural N-para-1 baseada na probabilidade a qual o peptídeo será bioativo. Este

servidor possui uma calibração em um limite de 0,5, ou seja, qualquer peptídeo previsto acima deste valor é rotulado como bioativo [46].

A toxicidade dos peptídeos avaliada pelo ToxinPred que pode ser acessado pelo endereço eletrônico: http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/ [47]. As características físico-químicas das sequências dos peptídeos dos três hidrolisados obtidos foram avaliadas pelo servidor Expasy utilizando as ferramentas Compute e ProtParam (http://web.expasy.org/) usada para estimar o ponto isoelétrico e a massa molecular (Da), a hidrofilicidade, o índice de Boman, a resistência térmica e o índice alifático, a grande média de hidropaticidade (GRAVY), o índice de instabilidade e a fórmula química. A carga neutra, a hidrofobicidade e o comprimento foram estimados pela ferramenta PepDraw (https://pepdraw.com/).

Baseado nos resultados, a predição da bioatividade foi realizada no tratamento que obteve maior número de peptídeos a partir da busca na base de dados online BIOPEP. Onde foram calculados dois parâmetros relativos as atividades biológicas em potencial: o parâmetro A que retorna a frequência da ocorrência dos fragmentos bioativos em uma sequência da proteína e B que avalia o potencial da atividade biológica [48,49]. Assim, com base nesses parâmetros foram selecionados os peptídeos que apresentaram maior potencial de bioatividade para estimar a composição química utilizado a ferramenta PepDraw [50]. Por fim, dentre os 3 hidrolisados analisados foi escolhido para as etapas subsequentes aquele tratamento o qual as características bioativas pelos métodos *in sílico* e *in vitro* testados demonstraram maior potencial.

2.12. Ensaio comportamental *in vivo* com modelo Zebrafish (Danio rerio)

2.12.1. Modelo animal e grupos testes

Neste ensaio foram utilizados peixes-zebras silvestres (Danio rerio) (idade de 90 a 120 dias; Peso 0,4 ± 0,1 g, comprimento 3,5 ± 0,5 cm), de ambos os sexos, adquiridos em loja local (Fortaleza, CE). Os animais foram mantidos em um aquário de vidro (30 × 15 × 20 cm) de 10 L (n = 3 / L), a temperatura de 25 ± 2 ° C, em ciclos claro-escuro de 24 h com água clorada (ProtecPlus®) e bomba de ar com filtros submersos, sob temperatura de 25 ± 2 ° °C, pH 7,0, ciclo circadiano de 10 - 14 h (claro/escuro). Os peixes receberam ração (Spirulina®) *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Antes das aplicações dos medicamentos os animais foram anestesiados em água gelada e, após os experimentos foram sacrificados por imersão em água gelada (2 e 4 ° C) por 1 min até a perda dos movimentos operculares. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; nº 04983945/2021), estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal.

Os Zebrafish (Zfa) de ambos os sexos foram selecionados aleatoriamente nos experimentos, anestesiados em água gelada e transferidos para uma esponja úmida. Para os experimentos os animais foram divididos nos grupos (n=6): grupo teste tratado com 20 µL do hidrolisado (4; 20 e 40 mg/kg); o grupo tratado com diazepam - DZP (4 mg.kg - controle positivo) e o grupo tratado com DMSO 3% (controle negativo - diluente das drogas). Para os testes do sistema GABergico os animais receberam flumazenil (4 mg.kg; 20 µL; 20 µL) (antagonista GABAA) todos os grupos receberam os tratamentos por via intraperitoneal (i.p).

Para obter maior precisão dos resultados, todo o processo de testes comportamentais foi realizado em um ambiente tranquilo e estável e antes dos testes os animais foram acondicionados individualmente em béquer de vidro com 150 mL de água do aquário para aclimatação dos animais e mantidos em repouso para as análises subsequentes.

2.12.2. Avaliação da atividade locomotora

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar a presença ou ausência de alterações na coordenação motora dos animais, seja devido ao efeito ansiolítico e / ou relaxamento muscular [51].

2.12.3. Toxicidade aguda 96 h

Após o teste de campo aberto, os animais foram deixados em repouso para análise da taxa de mortalidade por um período de 96 h, registrando-se a cada 24 h o número de peixes mortos em cada grupo, sendo a dose letal capaz de matar 50 % dos animais (DL50) determinada pelo método matemático Trimmed Spearman-Karber com intervalo de confiança de 95% [52].

2.12.4. Avaliação ansiolítica – Teste claro/escuro

O comportamento de ansiedade dos animais foi realizado em aquário de vidro dividido em uma área clara e uma área escura. O aquário foi cheio até 3 cm com água da torneira sem cloro, o que simulou um novo ambiente raso diferente do aquário convencional e capaz de induzir comportamentos de ansiedade. Após 1 h, os animais foram colocados individualmente na zona clara e o efeito ansiolítico foi medido com base no tempo gasto na zona clara do aquário dentro de 5 min de observação. A dose que apresentou melhor efeito ansiolítico foi usada para a condução dos testes posteriores [53].

2.12.5. Avaliação da neuromodulação GABAérgica

A neuromodulação GABAérgica envolvida no efeito ansiolítico do hidrolisado foi identificada através do pré-tratamento com flumazenil (antagonista GABAA) antes do teste claro/escuro. O flumazenil foi administrado nos animais e após 15 min, foi aplicado o hidrolisado do soro do leite caprino. Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram submetidos de novo ao teste claro/escuro descrito na seção anterior [54].

2.12.6. Convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ)

A reversão da convulsão induzida por PTZ foi investigada como descrito por Siebel et al. (2015). Os animais foram expostos individualmente por imersão em 7,5 mM de PTZ dissolvido em água e o comportamento semelhante à convulsão em três estágios foi avaliado: estágio I - aumento drástico da atividade natatória; estágio II - comportamento em redemoinho; estágio III - crises semelhantes ao clônus, seguidas de perda de postura quando o animal cai para o lado e permanece imóvel por 1-3 s. Ao final da avaliação das três etapas do teste, os animais foram eutanasiados no gelo.

2.12.7. Envolvimento do sistema GABAérgico na convulsão

Os peixes receberam flumazenil e após 15 min foram tratados com o hidrolisado (4 mg.kg; 20 µL; i.p.). Após 1 h de tratamentos, os animais foram expostos individualmente a 7,5 mM de PTZ e os três estágios de convulsão foram avaliados conforme descrito anteriormente [51].

2.13. Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância one way (ANOVA). As diferenças entre os grupos estudados foram analisadas utilizando o teste de média Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância empregando o software GraphPad Prisma para Windows (GraphPad Software, Inc. versão 7.0) assim como os diagramas e tabelas das análises de bioinformática. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$. Os resultados do planejamento experimental foram avaliados utilizando o software STATISTICA 7. Os gráficos referentes as análises de fluorescência intrínseca, foram ajustados pelo software ORIGIN PRO 8.5. Os resultados dos testes com o Zebrafish foram submetidos à análise de variância - ANOVA unidirecional ou two-way ANOVA, seguido do teste de Tukey e o nível de significância de 5% ($p<0,05$) empregando o software GraphPad Prism v. 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros físico-químicos e concentração das proteínas do soro do leite caprino

A caracterização físico-química do soro do leite caprino foi respectivamente (g/100g base úmida): umidade (95,12 ±0,01), atividade de água (0,890), EST (4,88 ±0,01), cinzas (0,16 ±0,11), acidez (2,06 ±0,14), lactose (6,14 ±0,11) gordura (0,27 ±0,05), proteínas totais (0,53 ±0,12). A composição química do soro do leite caprino pode ser afetada por diversos fatores, dentre eles a raça, o tipo de precipitação se a partir da ação de ácidos ou por atividade enzimática, a fase de lactação, a alimentação dos animais, a sazonalidade da ordenha dentre outros [56].

Após submeter o soro do leite caprino a ultrafiltração por membranas com diferentes *cut-off* de peso molecular o melhor resultado foi obtido ao utilizar a membrana de 3 kDa de *cut-off* a qual reteve 26,7% de proteína (base seca). De acordo com Bustamante et al. (2021) um pó que contenha acima de 25% de proteínas após processos de separação, filtração e secagem pode ser considerado um concentrado proteico, o que demonstra a eficiência do protocolo de purificação das proteínas do soro do leite caprino. Este resultado corrobora com os resultados encontrados por Baldasso et al. [58] que observou um aumento de 15 para 60% no conteúdo de proteína do soro do leite após ultrafiltração.

3.2. Planejamento experimental e avaliação de desempenho do modelo nos elementos de regressão

A necessidade de otimização do processo enzimático vem sendo reportada por vários autores como uma forma eficaz de produção de hidrolisados proteicos [12,59,60]. Hussein et al. [61] justifica a necessidade de otimização mesmo com enzimas comerciais que tem parâmetros de atividade recomendados pelo fabricante. Uma vez que a hidrólise é um processo multifatorial e condições ideais são subjetivas a depender do objetivo, realizar um estudo de otimização proporciona dados com intervalos mais confiáveis e cria uma correlação fiel entre os parâmetros e a resposta do planejamento.

A partir da avaliação do DCCR verificou-se a influência dos parâmetros pH e tempo no grau de hidrólise, obtendo-se a equação do modelo: $GH\ \% = 37,59 - 11,54\ (T)\ 2 + 1,75\ (pH)^2$.

Através dos valores da análise de variância (ANOVA) dispostos na tabela 1 do material suplementar o valor f (teste de Fischer) da regressão calculado foi maior que o valor de f tabelado, e desta forma o modelo é estatisticamente significativo para $p<0,005$, o coeficiente de determinação R^2 foi de 0,9428, ou seja 94,28% da variância dos dados de resposta foram explicados por esse modelo. Em relação a falta de ajuste do modelo, o valor de f calculado foi menor que o de tabelado, implicando que o modelo não apresentou falta de ajuste sendo adequado para descrever os dados de grau de hidrólise em função do tempo e do pH.

A significância dos coeficientes de regressão foi determinada pelos valores p listados na Tabela 1 do material suplementar. A relação das variáveis dependentes pH e tempo de hidrólise, na variável resposta, grau de hidrólise, é ilustrada no gráfico de superfície de resposta (Fig. 1 material suplementar) e no gráfico de Pareto (fig. 2 material suplementar). De acordo com a superfície de resposta observou-se que nas zonas destacadas em vermelho o pH 2,25 e o tempo de 150 min retornaram os maiores valores de GH (em média 37%), sendo estes valores correspondentes aos experimentos do ponto central do planejamento estatístico, que foi repetido 3 vezes aleatoriamente.

Conforme o gráfico de Pareto (Fig. 2 material suplementar) verificou-se que o tempo foi a variável que mais influenciou no grau de hidrólise, seguida do pH, e mesmo com um tempo de reação relativamente curto (máx 192 min) quando comparado a outros estudos [7,62] mais de 50% dos ensaios apresentaram GH maior que 15%, demonstrando que a pepsina é uma boa escolha para hidrolisar proteínas do soro do leite caprino.

De acordo com a tabela 1, os experimentos demonstram valores de GH entre 8,98 e 37,68 % utilizando diferentes combinações de pH e tempo de reação. Os resultados observados foram diferentes daqueles encontrados por Morales García et al. [73] ao hidrolisar proteínas do soro do leite com Flavourzyme e Alcalase entre 60 e 300 min que obteve hidrolisados com variações de GH entre 7 e 20%. Essa diferença pode estar relacionada a característica da enzima, pois a pepsina é uma protease aspártica com baixa especificidade, apresentando maior afinidade por aminoácidos polares e aromáticos preferencialmente C-terminal de Phe, Glu e Leu [28].

Os maiores valores de grau de hidrólise foram atribuídos a baixa especificidade da pepsina, que possibilita clivar as proteínas em diferentes sítios de ligação aumentando assim a probabilidade de produção de peptídeos. A opção da hidrólise com pepsina também é relatada por outros autores como uma escolha interessante para melhorar as propriedades bioativas de hidrolisados de proteína do soro (não bovino) quando comparadas a outras enzimas [16,64].

O valor de GH de 37% foi similar ao encontrado por Alizadeh; Aliakbarlu, (2020) de 37.74 ± 0.75 para hidrólise por 3 horas de proteínas do soro do leite (bovino) com pepsina em pH 2,51 no entanto, estes autores aplicaram pré-tratamentos como ultrassom e aquecimento ômico que possibilita maior abertura das estruturas proteicas que ocasiona maior facilidade na atividade enzimática. No caso desse estudo, não foi aplicado nenhum pré-tratamento nas amostras, e ainda assim valores de GH semelhantes ao estudo de Alizadeh;Aliakbarlu [13] foram alcançados e isto possivelmente está relacionado as características diferentes entre as proteínas do leite caprino e bovino. Estes autores também demonstraram que mesmo a pepsina atuando em uma faixa de pH de 1 a 4.0, modificações na faixa pH podem fazer com que valores maiores de grau de hidrólise sejam alcançados em menos tempo.

A faixa de pH 2,25 teve a maior influência no grau de hidrolise das proteínas do soro do leite caprino (Fig. 1), em uma condição de pH similar a utilizada por Kheroufi et al. (KHEROUFI et al., 2022b). Uma vez que o grau de hidrólise é uma medida que está relacionada ao tamanho e a frequência dos peptídeos gerados pela quebra da proteína foi escolhido avaliar os 3 intervalos de tempo dentro dessa faixa de pH (de 2,25), que são correspondentes aos valores

de GH menor, intermediário e maior (dentre os 11 experimentos) para dar seguimento ao nosso estudo. Assim verificou-se a influência do tempo de hidrolise, o efeito mais significativo, (Fig. 2) nas características dos hidrolisados do soro do leite caprino.

3.3. Caracterização parcial dos hidrolisados do soro do leite caprino

A caracterização dos hidrolisados do soro do leite caprino está descrita na Tabela 3, onde pode ser visto que há uma tendência de associação entre os valores do grau de hidrólise com a quantidade de aminoácidos livres e de proteínas solúveis. Essas análises frequentemente são utilizadas para estimar a eficiência do processo de hidrólise e os resultados mostram que conforme o grau de hidrólise aumenta, o maior valor em 37,62%, houve também maior quantidade de proteínas solúveis (2,13 para 17,68 mg.mL) e de liberação de aminoácidos livres e aromáticos [66].

Variável	**Valores**			
	WPNH	**WPH T1**	**WPH T2**	**WPH T3**
Grau de hidrólise %	-	$8,98 \pm 0,02^{c}$	$37,62 \pm 0,01^{c}$	$22,74 \pm 0,04^{c}$
Proteína solúvel TCA ($mg.mL^{-1}$)	$2,13 \pm 0,02^{d}$	$5,07 \pm 0,01^{c}$	$17,68 \pm 0,05^{a}$	$11,81 \pm 0,02^{b}$
Proteínas ($mg.mL^{-1}$)	$33,03 \pm 0,15^{a}$	$6,98 \pm 0,05^{c}$	$2,55 \pm 0,04^{d}$	$12,42 \pm 0,01^{b}$
Aminoácidos livres (200 mg/L)	$0,584 \pm 0,06^{d}$	$0,976 \pm 0,01^{c}$	$1,144 \pm 0,04^{a}$	$1,025 \pm 0,01^{b}$
Turbidez (OD)	0,051	0,105	0,283	0,436

Tabela 3. Características dos hidrolisados do soro do leite caprino em diferentes tempos de hidrólise

WPNH soro do leite não hidrolisado, WPHT1 soro do leite hidrolisado tempo 107 min, WPHT2 soro do leite hidrolisado tempo 150 min, WPHT3 soro do leite hidrolisado tempo 192 min; Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística, $p<0,05$ entre os tratamentos

O aumento no valor de proteína solúvel quando precipitadas pelo TCA indica a presença de peptídeos pequenos, tendo uma relação inversamente proporcional com o conteúdo de proteína sem a adição do TCA, uma vez que apenas proteínas maiores que 3 kDa podem ser mensuradas pelo método de Bradford. Resultados similares para a quantidade de proteínas solúveis com e sem precipitação por TCA foram encontrados por Lermen et al. e Mellinger-Silva et al. [67,68], respectivamente.

Contudo, uma exposição acima de 150 min não influenciou positivamente no grau de hidrólise sugerindo que entre o tempo de 150 e 192 min a enzima alcançou uma fase platô resultante da saturação enzimática e imprevisivelmente o grau de hidrólise, as proteínas e os aminoácidos livres diminuíram no tempo de 192 min. Estes resultados podem ser esclarecidos pelo valor de turbidez, uma vez que o aumento da turbidez está relacionado a exposição de grupos de aminoácidos hidrofóbicos que formam agregados insolúveis, causando diminuição na quantidade de proteínas solúveis e de aminoácidos livres na amostra, e consequentemente diminuindo o GH por haver menos cadeias laterais disponíveis para interagir com o reagente de OPA [69].

O mesmo comportamento foi observado por Singh, Siddiqi e Sogi (2019) [70] ao avaliarem a otimização de hidrolisados da proteína de farelo de arroz, estes autores atribuem o

fenômeno a possível formação de peptídeos que agem como competidores às proteínas não hidrolisadas. Neste estudo também foi observado que o tempo de 150 min foi o ideal para a atividade da papaína que é uma endopeptidase assim como a pepsina utilizada em nosso estudo sugerindo que a forma de ação da enzima pode ocasionar tais resultados.

Du et al. [7] estudando hidrolisados de proteína do soro do leite caprino verificou graus de hidrólise aproximados de 35.54 % usando Alcalase e 32.28 % com papaína por 6 h de hidrólise, tempo superior ao feito nesse estudo com pepsina.O que demostra a eficácia do planejamento experimental e da enzima utilizada, refletindo na redução de custos e de tempo de processo o que é favorável para diferentes segmentos da indústria de produtos.

3.4. Solubilidade

A solubilidade é uma propriedade tecnológica de grande relevância que afeta também características funcionais, para a indústria de alimentos, entender o comportamento dos hidrolisados frente a mudanças de pH auxilia no potencial de sua utilização como ingrediente em alimentos e bebidas que apresentem características favoráveis a essa propriedade [71]

Foi avaliada a influência do pH na solubilidade em água dos hidrolisados proteicos (Fig. 4) e todas as amostras hidrolisadas demonstraram valores significativamente maiores ($p < 0.05$) de solubilidade quando comparadas a proteína não hidrolisada para todas as faixas de pH testadas, o que confirma a eficácia do processo de hidrólise em melhorar características tecnológicas das proteínas também evidenciado por Kheroufi et al. (KHEROUFI et al., 2022b). Esse aumento da solubilidade após a hidrólise da proteína pode estar relacionado com a obtenção de fragmentos proteicos menores e de peptídeos com características hidrossolúveis.

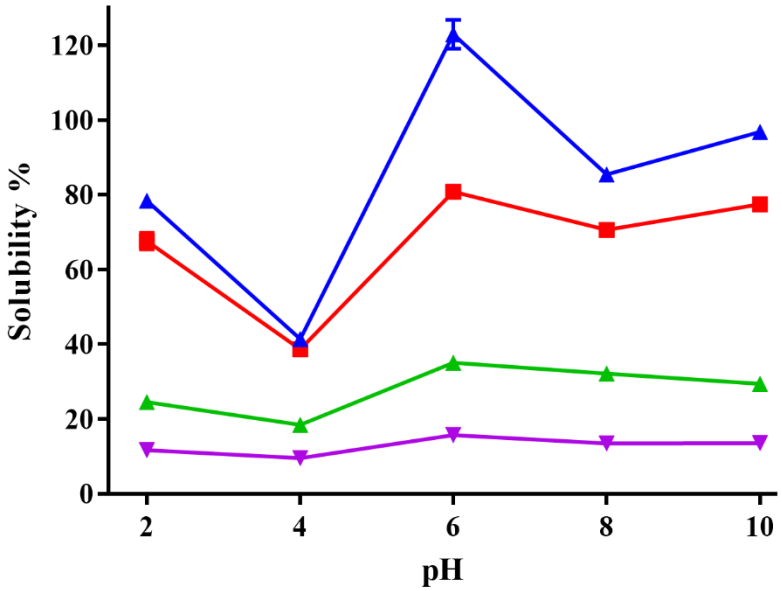


Figura 1. Avaliação do parâmetro tecnológico solubilidade dos hidrolisados do soro do leite caprino ▼ – WPNH; ▲- WPH T1; ► - WPH T2; ■ – WPH T3

Contudo há diferenças no comportamento dependendo da progressão da hidrólise das proteínas. O maior GH resultou no maior valor de solubilidade em pH 6, 122,94 % enquanto que no mesmo pH 120 min de hidrolise mostrou solubilidade 4x vezes menor, isso pode estar relacionado aos fatores estruturais dos peptídeos liberados em cada hidrolisado, como a carga residual e a superfície de hidrofobicidade [72]. Kheroufi et al. (2022a) sugeriu que maiores GH

são resultantes de hidrólises com enzimas menos específicas, produzindo maior variabilidade de peptídeos hidrofílicos e aumentando a taxa de solubilidade.

O pH 4 apresenta uma influência importante nos valores de solubilidade das amostras, para todos os tratamentos há uma queda no valor da solubilidade enquanto que ao se aproximar do pH neutro há um aumento intenso na solubilidade das proteínas, tendência essa que também foi observada por Jeewanthi; Lee; Paik, e Kheroufi et al. [73,74]. Esse comportamento se justifica pela aproximação com o pH do ponto isoelétrico da proteína mais abundante no soro do leite, a β-Lg, nesse ponto há uma tendência de neutralização das cargas residuais diminuindo forças eletrostáticas e ocasionando diminuição na solubilidade da proteína por aumentar as interações proteína-proteína. Quando o pH se afasta para valores acima do ponto isoelétrico, os radicais se ionizam e as moléculas tendem a se repelir gerando maior interação proteína-água e assim aumentando a solubilidade [75].

3.5. Avaliação da hidrólise por eletroforese SDS-PAGE Tricina

Através do perfil eletroforético apresentado na Figura 2 pode ser visualizado a capacidade da pepsina em hidrolisar as proteínas do soro do leite caprino, possibilitando o aparecimento de bandas relativas a proteínas de menor peso molecular simultaneamente ao desaparecimento ou a diminuição da intensidade das bandas das proteínas não hidrolisadas. Essa tendência confirma a proteólise das proteínas do soro do leite caprino pela ação da pepsina [7,76].

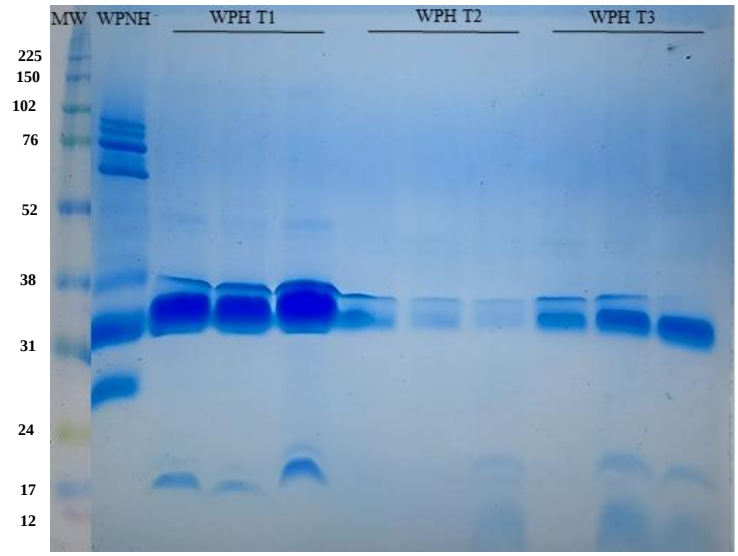


Figura 2. Perfil peptídico e proteico por eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina

MW: Marcador de peso molecular; WPNH soro do leite não hidrolisado, WPHT1 soro do leite hidrolisado tempo 107 min, WPHT2 soro do leite hidrolisado tempo 150 min, WPHT3 soro do leite hidrolisado tempo 192 min

As proteínas majoritárias β-Lg e α-La possuem em torno de 28 e 33 kDa, respectivamente e conforme o grau de hidrólise aumenta, a banda se torna menos intensa ou some completamente, após um período de tempo de 192 min. Kheroufi et al. [65] ao utilizar pepsina de frango na hidrolise das proteínas do soro do leite observou maior resistência das proteínas globulares à quebra das cadeias peptídicas, o desaparecimento das bandas na eletroforese Tris-Tricina só foi possível de observar após 6 horas de hidrólise, tempo quase 3 vezes superior ao utilizado nesse trabalho. Identificou-se também com base no peso molecular a presença de frações de K-caseína (~42 kDa), albumina do soro (~68 kDa), imunoglobulinas (~100 kDa), o sistema lactoperoxidase (~74 kDa) e lactoferrina (~80 kDa).

A hidrólise de proteínas globulares é de grande interesse, pois sua estrutura rigida dificulta o ataque das proteases as ligações peptídicas. O perfil eletroforético foi diferente dos encontrados por Hinnenkamp & Ismail [77] esses autores não observaram diferenças significativas no perfil eletroforético entre os hidrolisados e as proteínas de maiores pesos moleculares, a intensidade das bandas das proteínas majoritárias permaneceram intensas mesmo após a hidrolise com a protease M. Logo o aparecimento de bandas correspondentes a frações de menor peso molecular no gel de eletroforese (Fig. 5) confirma a pepsina como uma enzima efetiva na obtenção de fragmentos proteicos de menor peso molecular proveniente do soro do leite caprino que podem exercer bioatividade.

3.6. Fluorescência intrínseca dos hidrolisados proteicos do soro do leite caprino

A aquisição dos espectros de fluorescência intrínseca de hidrolisados proteicos é uma ferramenta importante para investigar modificações conformacionais na estrutura terciária da proteína e indica uma medição da atividade superficial dos peptídeos. [39,78].

Resíduos de aminoácidos como triptofano, fenilalanina e tirosina emitem um sinal de florescência quando as proteínas são excitadas, sendo os resíduos de triptofano mais influentes nos resultados da intensidade de fluorescência pois das proteínas presentes no soro, a β-Lg possui dois resíduos de triptofano, α-La possui quatro resíduos de triptofano, a albumina do soro possui dois resíduos e a lactoferrina apresenta sete resíduos que contribuem para a fluorescência intrínseca e são excitados em um comprimento de onda de 292 nm [79].

Na figura 3 está representado o comportamento da fluorescência dos hidrolisados proteicos do soro do leite caprino. Os de maiores valores de GH (WPH T2 e T3) alcançaram picos mais intensos, em torno de 500~600, enquanto que o soro do leite não hidrolisado apresentou pico em torno de 100~200, sugerindo uma exposição maior de grupos de aminoácidos aromáticos para hidrolisados com maior GH, resultado das alterações conformacionais devido a ação da pepsina nas proteínas do soro do leite. Os resultados corroboram aos encontrado por Du et al. (2022) para hidrolisados de proteína do soro do leite caprino com graus de hidrólise semelhantes (35.54 % usando Alcalase e 32.28 % com papaína por 6 h de hidrólise) aos que foram obtidos nesse estudo.

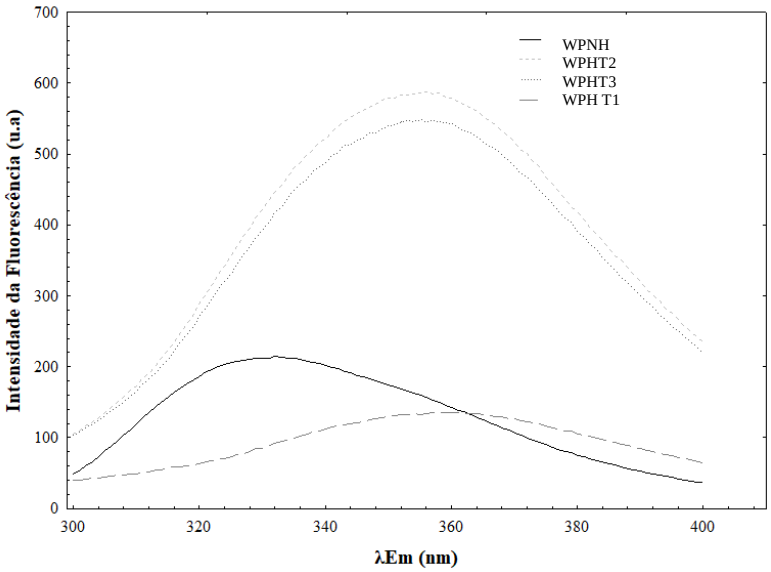


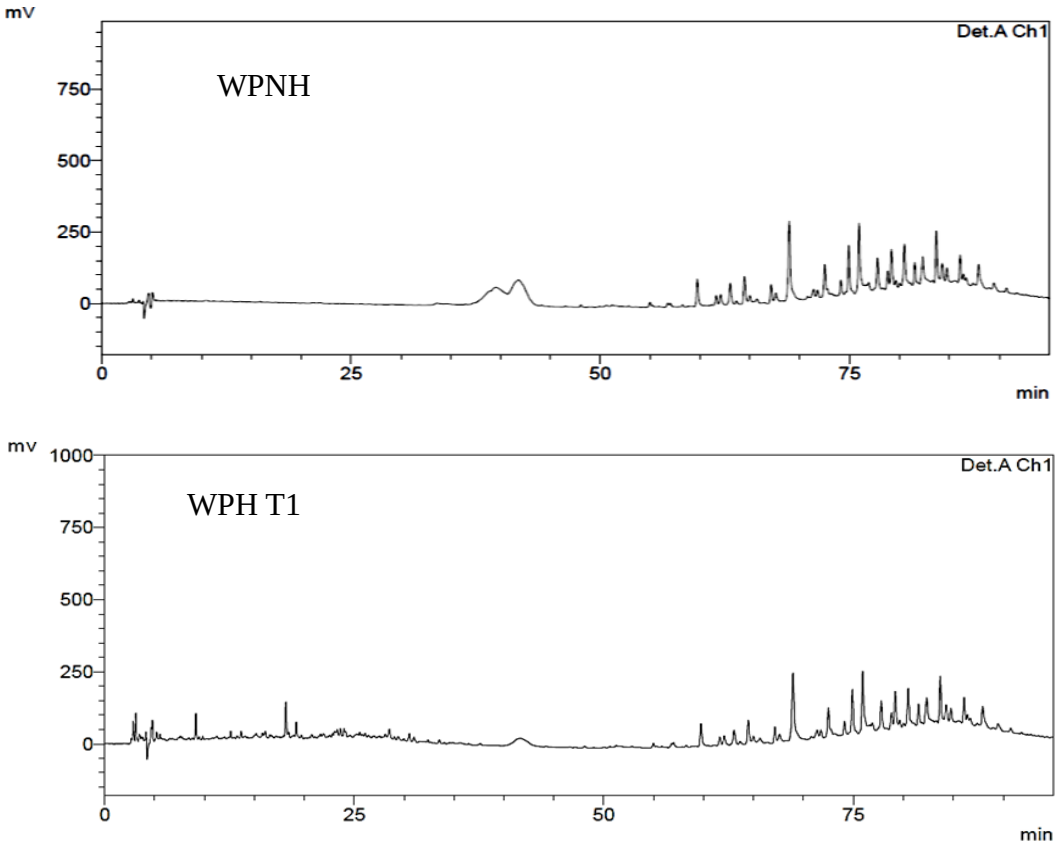
Figura 3. Comportamento da fluorescência intrínseca

O hidrolisado com menor GH (WPH T1), mesmo com comprimento de onda semelhante aos outros hidrolisados (WPH T2 e T3), mostrou uma intensidade de fluorescência até menor do que a da proteína não hidrolisada, resultado observado também por Zheng et al. [80]. O menor tempo da ação da pepsina nesse tratamento contribuiu com a formação de agregados proteicos diminuindo as proteínas solúveis (Tab 4) resultando em interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos e possivelmente ocultando os resíduos de triptofano que emitem um melhor sinal de fluorescência.

Todos os hidrolisados também foram red-shifted, i.e. apresentaram uma mudança na frequência da luz deslocando o pico para direita do gráfico, isso acontece porque os resíduos de aminoácidos que estavam anteriormente encriptados na sequencia original da proteína foram expostos e causam alterações na estrutura terciária devido a mudanças no ambiente apolar dos resíduos de triptofano [81].

3.7. Perfil de hidrofobicidade por cromatografia liquida de alta eficiência em fase reversa

As proteínas e peptídeos presentes nas amostras do soro do leite caprino foram avaliadas por RP-HPLC (Figura 4). Os tempos de retenção nos cromatogramas estão relacionados a hidrofobicidade dos peptídeos, sendo que os peptídeos hidrofílicos com maior polaridade apresentam tempos de retenção mais curtos, e conforme o gradiente do eluente B aumenta, os peptídeos hidrofóbicos e de polaridade inferior aparecem no cromatograma exibindo maior tempo de retenção [13,82]



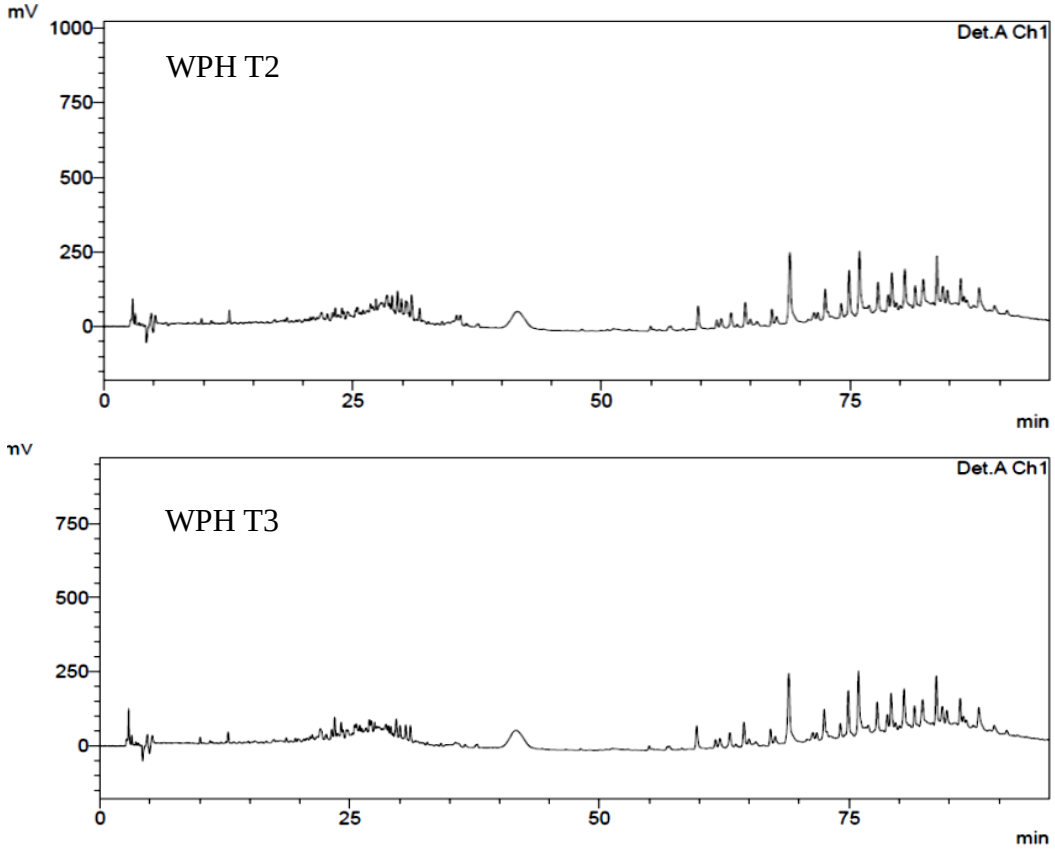


Figura 4. Caracterização dos hidrolisados da proteína do soro do leite caprino por RP-HPLC

Para as amostras de proteína hidrolisada pode ser percebido o aparecimento de picos correspondentes a frações proteicas de baixo peso molecular que foram eluidas nos 40 primeiros min de corrida, resultados consistentes com os encontrados por Spellman; Ocuinn; Fitzgerald. [83], e confirmados pelos resultados da eletroforese. Estes picos estão ausentes na proteína nativa sugerindo que a hidrolise resultou no aparecimento de peptídeos com características hidrofílicas responsáveis pelo aumento da solubilidade dos hidrolisados proteicos, perfil similar ao encontrado por Jiang et al. [84] ao avaliar hidrolisados proteicos de soro do leite isolado.

Para a proteína não hidrolisada ocorreu o aparecimento de dois picos entre 35 e 45 min, similar aos encontrados por Ballatore et al. [12] que observou tempos de retenção para α-La e β-Lg após 30 min de corrida, sugerindo que esses picos são dessas duas proteínas. Ao verificarmos a presença desses picos nos hidrolisados foi observado que o pico em 35 min desaparece e o de 45 min diminui de intensidade, mostrando a efetividade da pepsina na hidrólise α-La e β-Lg corroborando com os resultados observados na eletroforese SDS-Page Tricina.

O hidrolisado com menor GH mostrou uma diferença na intensidade e sobreposição dos picos, além de aumentar o número de peptídeos hidrofílicos, quando comparados as outras amostras, essa mudança no cromatogramas dos picos corrobora com os resultados encontrados de fluorescência intrínseca e solubilidade das proteínas demonstrando que para WPH T1 o perfil de hidrofobicidade é mais acentuado. Assim como Bezerra et al. [40] foi visto que houve correlação do grau de hidrólise com os picos formados, onde a amostra com grau de hidrólise

menor tem menores quantidades de picos sobrepostos e frações menores quando comparadas as de maior grau de hidrólise.

3.8. Atividade antioxidante

Diversos métodos podem ser utilizados para a avaliar o potencial antioxidante de peptídeos, dentre os quais os métodos ABTS e DPPH. A figura 8 (A e B) traz os resultados de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos quando comparados a proteína nativa.

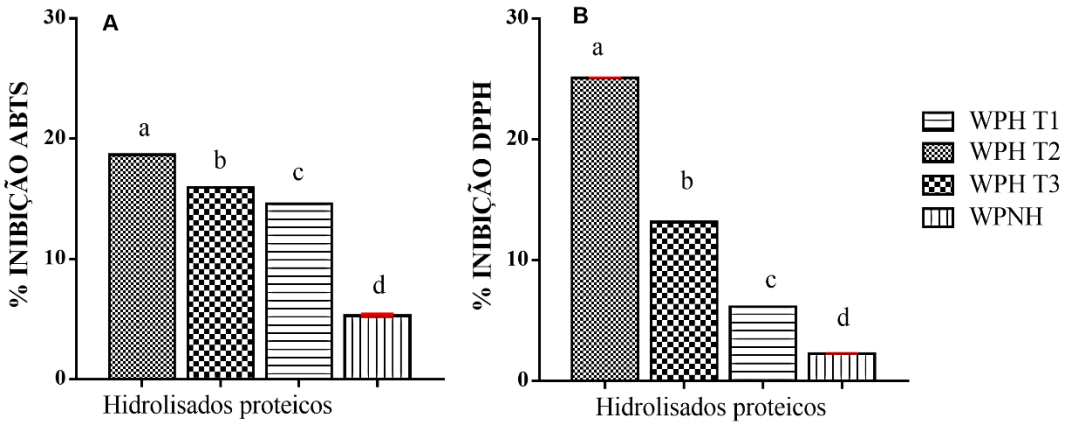


Figura 5. Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método ABTS (A) e DPPH (B)

Os resultados indicam que a hidrólise foi um processo eficaz para aumentar a atividade antioxidante, uma vez que após a ação da enzima ocorreram mudanças estruturais que alteraram o potencial bioativo. A formação de fragmentos proteicos menores, com características hidrofóbicas e a maior exposição dos aminoácidos cisteína (C), metionina (M), lisina (K), histidina (H), tirosina (Y), e o triptofano (W) podem ter contribuído com o aumento da habilidade antioxidante das amostras (BALLATORE et al., 2020; CHANDRAPALA et al., 2011).

Para os dois métodos realizados uma relação linear entre o grau de hidrólise e a atividade antioxidante pode ser observada, esses resultados são consistentes com outros estudos que atribuem maiores valores de GH a um aumento na atividade antioxidante (ALIZADEH; ALIAKBARLU, 2020). O percentual de inibição de WPH T2 de 18,68 para ABTS e 25,11 para DPPH corroboram com os encontrados por Alizadeh & Aliakbarlu, (ALIZADEH; ALIAKBARLU, 2020) os autores observaram valores de atividade antioxidante de 21 % para o método ABTS e 27 % para o DPPH ao testar os hidrolisados de proteína do soro concentrada, verificando a ocorrência de um efeito funcional sinérgico dos peptídeos presentes nos hidrolisados.

3.9. Perfil peptídico LC/MS e avaliação in sílico dos peptídeos obtidos

A espectrometria de massas de alta resolução foi utilizada para identificação do perfil peptídico obtido a partir da hidrolise com pepsina do soro do leite caprino nos diferentes tempos de hidrólise. No total, para as 3 amostras, foram identificados 145 peptídeos assim divididos: 120 min: 45 peptídeos; 150 min: 54 peptídeos; e 180 min 46 peptídeos. A figura 6 contém a relação entre os peptídeos gerados com as proteínas de origem. WPH T2 foi o tratamento que teve maior número de peptídeos (54) e que melhor hidrolisou a β-Lg, uma proteína de estrutura

globular que apresenta maior resistência a ação de proteases devido as suas características estruturais [88].

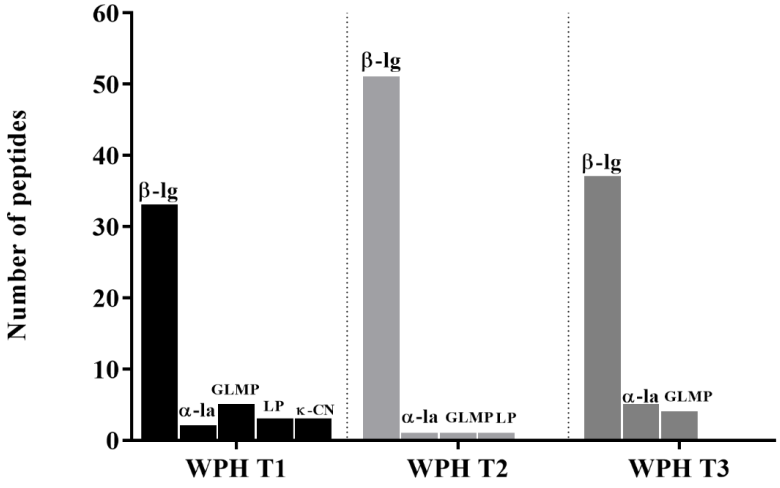


Figura 6 Quantidade de peptídeos gerados pela hidrólise com pepsina e proteínas originárias. β-lg: Beta-lactoglobulina; α-la: alfa-lactoalbumina; GLMP: Glicomacropeptídeo; LP: Lactoperoxidase; κ-CN: Kapa-caseína.

Um mapeamento de comparação entre as sequencias obtidas revelam algumas similaridades entre os tratamentos (Fig 7). Do total de 145 peptídeos 21 das sequências se repetiam nos 3 tempos testados, esse fenômeno pode acontecer pois estas sequencias provavelmente não tinham o padrão de aminoácidos específico da ação da enzima e assim não foram novamente hidrolisadas e se repetiram com o tempo.

Dentre as amostras a maior similaridade aconteceu entre os tempos de 120 e 150 min que compartilharam 13% de sequencias similares, resultados corroborados pelo grau de hidrolise, fluorescência intrínseca e eletroforese. Por fim os tempos de 150 e de 180 min foram registradas 17 sequencias únicas para cada amostra.

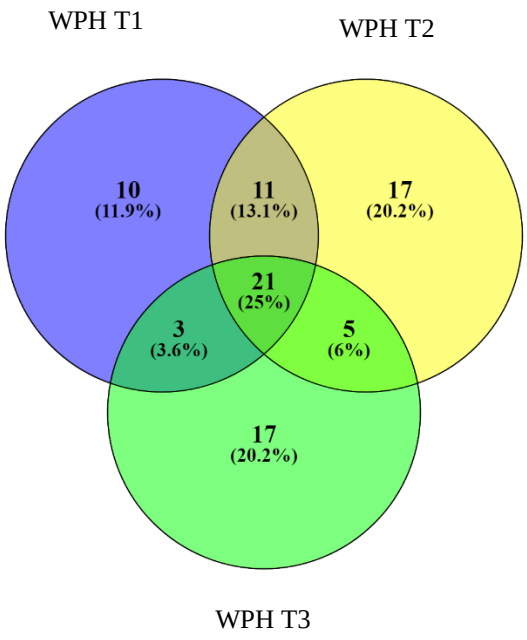
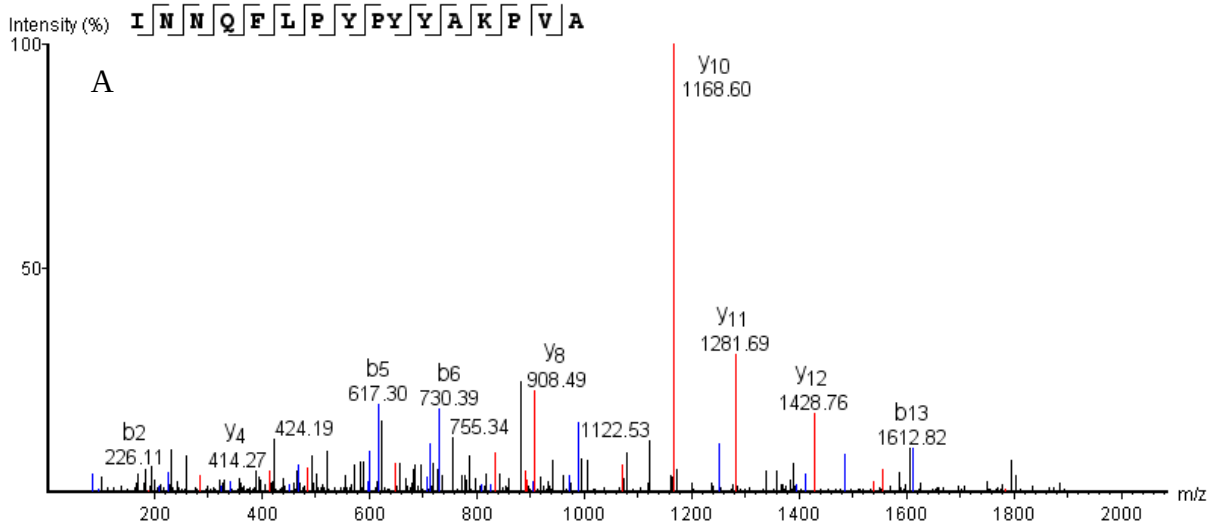


Figura 7. Distribuição das quantidades de peptídeos por tratamento via diagrama de venn

Ao analisar os espectros de *m/z* obtidos para cada amostra (Figuras 8 A-C) observou-se um padrão complexo de sinais devido à grande quantidade de peptídeos presentes nas amostras o que corrobora com os resultados anteriores e reitera a boa habilidade da pepsina no pH 2,25 de produzir peptídeos bioativos a partir das proteínas do soro do leite caprino.



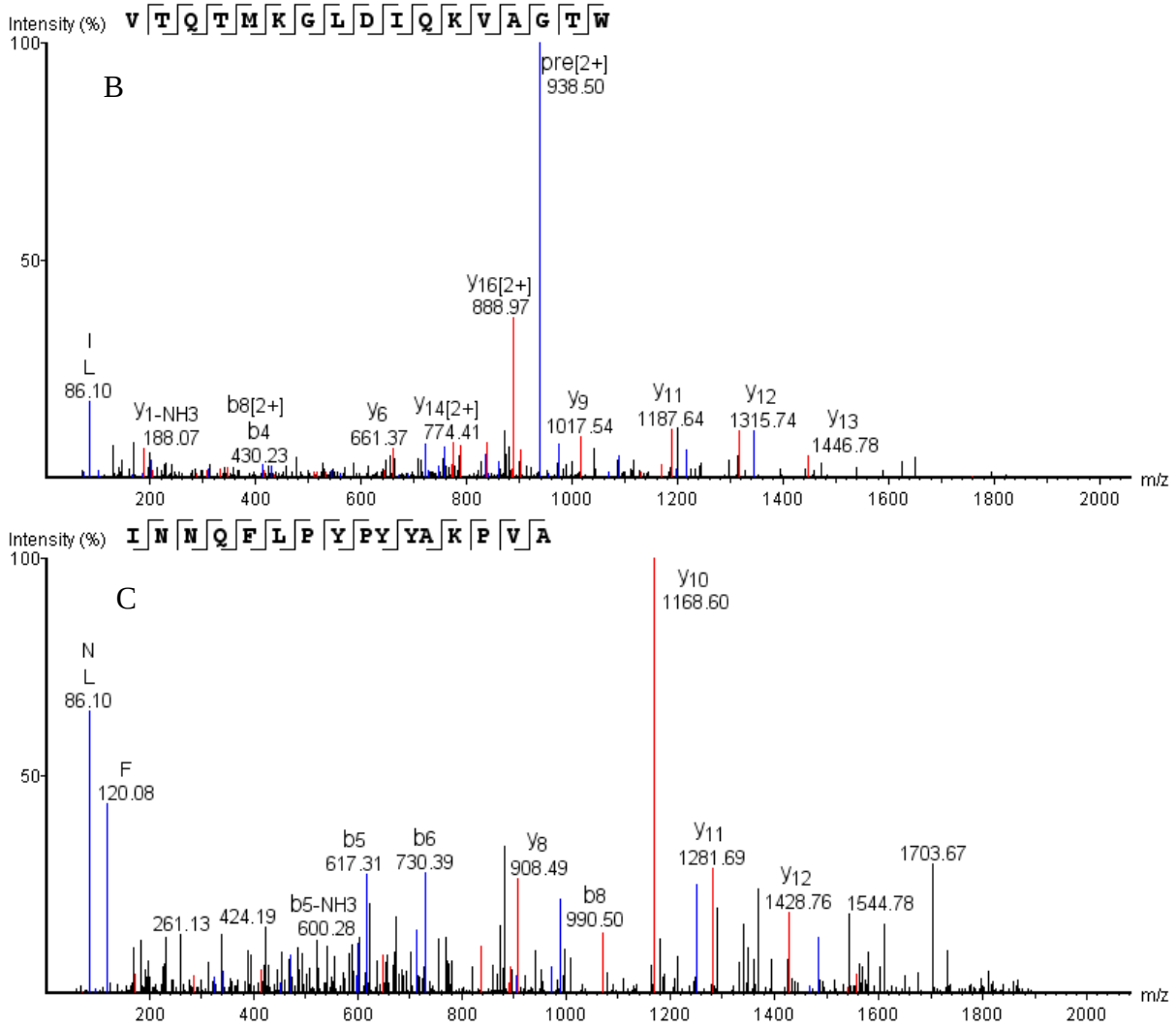


Figura 8. Espectros de massa carga obtidos por LC-MS de WPH T1(A), WPH T2 (B) e WPH T3 (C)

Todos os peptídeos foram analisados quanto as suas características físicas (Tabela 1, 2 e 3) e o que nos permitiu averiguar algumas diferenças entre os grupos estudados. O tamanho dos peptídeos obtidos variou a depender do tempo de tratamento, para o hidrolisado de menor e maior tempo o menor tamanho foi de 1.006.476 Da e o maior 31.467.637 Da, respectivamente. Para o tratamento de 150 min o de menor tamanho foi 6.603.595 e o maior 31.467.637.

Os tratamentos WPH T1 e WPH T2 foram similares quanto a alguns aspectos como os resíduos de aminoácidos (a.a.) e os tamanhos dos peptídeos obtidos. Para WPH T3 15 peptídeos tinham tamanhos menores que 10 kDa, 24 entre 10 e 20 kDa e 7 acima de 20 kDa, quanto aos resíduos de aminoácidos 15 tinham menos de 10 a.a., 27 entre 10 e 20 a.a. e 4 acima de 20 a.a.. Para WPH T1 13 sequencias foram menores que 10 kDa, 26 entre 10 e 20 kDa e 7 maiores que 20 kDa. Quanto aos resíduos de aminoácidos 15 sequencias apresentavam menos de 10 a.a.; 27 entre 10 e 20 a.a. e por fim 4 sequencias maior ou igual a 20 resíduos.

A amostra referente ao tempo de 150 min apresentou maior quantidade de peptídeos menores que 20 kDa, sendo estas 45 sequências, 50 sequencias tinham menos de 20 resíduos de aminoácidos, 40,74% das sequencias apresentavam p.I. básico e 66% dos peptídeos identificados são estáveis, demonstrando um perfil adequado ao objetivo do nosso estudo que é obter um hidrolisado com alto teor de peptídeos bioativos. No que diz respeito a toxicidade

nenhuma das sequencias (de todos os tratamentos) foi avaliada como tóxica ao consultar o ToxinPred.

Assim as sequencias WPH T2 foram avaliadas quanto a sua bioatividade a partir de duas ferramentas distintas. Peptide Ranker (Tabela 4) retornou que 13 sequencias apresentaram score acima de 0,5 e são, portanto, potencialmente bioativas. Baseado no potencial bioativo destas 13 sequencias outras características como hidrofilicidade, índice de Boman, resistência térmica e índice alifático foram avaliados para melhor caracterizar estes peptídeos.

Rank	Sequencia	Score	HF	SB	BI*	AI	NTA	TD
1	WWENPGVF	0.92466	-0.95	Low	0.1	36.25	138	<55°C
2	ALEKFDKALKALPMHIRL	0.884456	0.18	High	0.91	125.00	311	<55°C
3	FDKALKALPMHIRL	0.865466	-0.04	Low	0.76	125.71	245	<55°C
4	KFDKALKALPMHIRL	0.862784	0.17	High	1.08	117.33	266	<55°C
5	LEKFDKALKALPMHIRL	0.83614	0.22	High	1.07	126.47	301	<55°C
6	EKFDKALKALPMHIRL	0.81437	0.34	High	1.44	110.00	282	<55°C
7	PMHIRL	0.762027	-0.40	Low	1.23	130.00	112	<55°C
8	KALPMHIRL	0.747085	-0.19	Low	0.69	141.11	162	<55°C
9	DKALKALPMHIRL	0.738739	0.15	High	1.05	135.38	225	<55°C
1	AFNPTQL	0.624051	-0.69	Low	0.72	70.00	111	<55°C
11	DTDYKKYLLF	0.584451	0.09	High	1.85	78.00	185	55°C~65°C
12	LDAQSAPLRV	0.513384	0.04	High	1.5	127.00	155	<55°C
13	YGGVSLPEW	0.509385	-0.63	Low	-0.31	75.56	138	<55°C

Tabela 4 Avaliação do score de Bioatividade. HF: Hidrofilicidade; SB: Solubilidade; BI: Indice de Boman; AI: Indice Alifático; NTA: Número total de átomos; TD: Temperatura de derretimento

Por meio do BioPep foi avaliado quais sequencias retornavam melhores valores de A (frequência de ocorrência de fragmentos bioativos em uma sequência de proteína) e B (atividade biológica potencial), para as atividades de maior interesse paro nosso estudo, sendo estas: inibição da enzima conversora de angiotensina, inibição da enzima dipeptydil peptidase IV, antioxidante e atividade como neuropeptídeo (Tabela 5).

Peptide	Activity	A	B
VTQTMKGLDIQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.7059	0.0010724150809963
	ACE inhibitor	0.6471	0.0047593224853919
	Antioxidative	0.1176	
	Neuropeptide	0.0588	
YSLAMAASDISL	DPP IV inhibitor	0.5833	7.5079536229413E-5

	ACE inhibitor	0.2500	0.00048169410525889
YSLAMAASDISLL	DPP IV inhibitor	0.6154	6.9304187288689E-5
	ACE inhibitor	0.2308	0.00044464071254667
KIDALNENKVLVL	DPP IV inhibitor	0.6154	0.0063691183695463
	ACE inhibitor	0.3077	0.002166203599099
	Antioxidative	0.0769	
YSLAMAASDISLLDAQSAPLRV	DPP IV inhibitor	0.5000	0.00096635338052644
	ACE inhibitor	0.3636	4.6670027194317E-5
YVEELKPTPEGNL	DPP IV inhibitor	0.5385	6.2741670436278E-5
	ACE inhibitor	0.5385	0.24428922102158
	Antioxidative	0.4615	
	Neuropeptide	0.0769	
IIVTQTMKGLDIQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.6842	0.00095952928299667
	ACE inhibitor	0.5789	0.0042583411711401
	Antioxidative	0.1053	
	Neuropeptide	0.0526	
YVEELKPTPEGNLEIL	DPP IV inhibitor	0.5625	5.0977607229476E-5
	ACE inhibitor	0.5625	0.19962238971425
	Antioxidative	0.3750	
	Neuropeptide	0.0625	
TMKGLDIQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.6429	0.0013022183126383
	ACE inhibitor	0.7143	0.0057791773036902
	Antioxidative	0.1429	
	Neuropeptide	0.0714	
MAASDISLLDAQSAPLRV	DPP IV inhibitor	0.4444	3.4969715014455E-5
	ACE inhibitor	0.3333	0.00094957490746008
AFNPTQL	DPP IV inhibitor	0.8571	
	ACE inhibitor	0.4286	0.00075187969924812
ILNEPEDETHL	DPP IV inhibitor	0.6364	0.0024901719253879
	ACE inhibitor	0.2727	0.0016828056497642
	Antioxidative	0.0909	
IVTQTMKGLDIQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.6667	0.0010128364653854
	ACE inhibitor	0.6111	0.0044949156806479
	Antioxidative	0.1111	
	Neuropeptide	0.0556	
DKALKALPMHIRL	DPP IV inhibitor	0.7692	0.00023139690131824
	ACE inhibitor	0.8462	0.017133458926294
	Antioxidative	0.3846	
	Neuropeptide	0.1538	
DIQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.5556	0.0019831835095744

	ACE inhibitor	0.5556	0.00063671449192275
	Antioxidative	0.2222	
EKFDKALKALP MHIRL	DPP IV inhibitor	0.7500	0.00020743953077836
	ACE inhibitor	0.8750	0.016290084323448
	Antioxidative	0.3125	
	Neuropeptide	0.1250	
LDIQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.5000	0.0017848651586169
	ACE inhibitor	0.6000	0.0064553959839069
	Antioxidative	0.2000	
YGGVSLPEW	DPP IV inhibitor	0.7778	9.1025184031646E-5
	ACE inhibitor	0.6667	0.0011667604840788
TQTMKGLDIQK VAGTW	DPP IV inhibitor	0.6875	0.0011394410235585
	ACE inhibitor	0.6875	0.0050567801407289
	Antioxidative	0.1250	
	Neuropeptide	0.0625	
VTQTMKGLDIQ KVAGTW	DPP IV inhibitor	0.7059	0.0010724150809963
	ACE inhibitor	0.6471	0.0047593224853919
	Antioxidative	0.1176	
	Neuropeptide	0.0588	
FDKALKALPMHI RL	DPP IV inhibitor	0.7143	0.00021486855122408
	ACE inhibitor	0.8571	0.016093261437802
	Antioxidative	0.3571	
	Neuropeptide	0.1429	
IIVTQTMKGLD	DPP IV inhibitor	0.7273	3.4764071887929E-5
	ACE inhibitor	0.3636	0.001330034952869
	Neuropeptide	0.0909	
IIVTQTMKGLDI QKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.6842	0.00095952928299667
	ACE inhibitor	0.5789	0.0042583411711401
	Antioxidative	0.1053	
	Neuropeptide	0.0526	
KPTPEGNL	DPP IV inhibitor	0.1250	0.00010195521445895
	ACE inhibitor	0.5000	0.0061277439793216
	Antioxidative	0.1250	
	Neuropeptide	0.1250	
DTDYKKYLLF	DPP IV inhibitor	0.6000	
	ACE inhibitor	0.8000	0.011989824535284
	Antioxidative	0.5000	
	Neuropeptide	0.1000	
	Opioid agonist	0.1000	0.000625
	DPP IV inhibitor	0.6667	0.0012154037584624

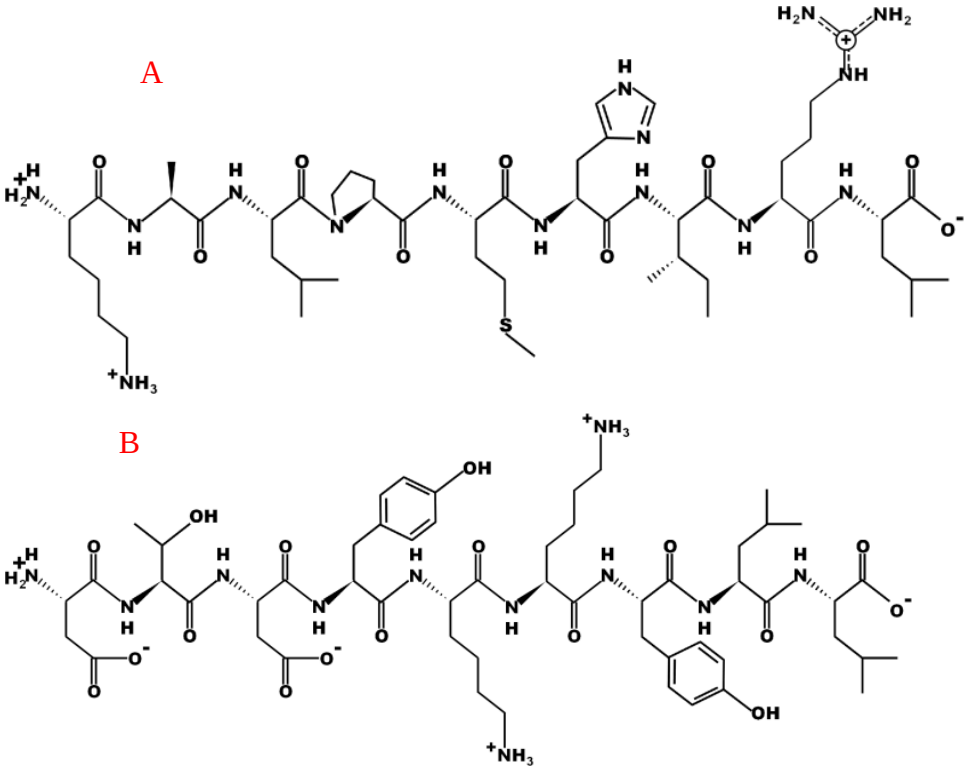
QTMKGLDIQKV AGTW	ACE inhibitor	0.6667	0.0053938988167775
	Antioxidative	0.1333	
	Neuropeptide	0.0667	
NENKVLVL	DPP IV inhibitor	0.6250	0.0033783783783784
	ACE inhibitor	0.2500	0.010316922613671
	Antioxidative	0.1250	
WWENPGVF	DPP IV inhibitor	0.7500	0.00022530641672675
	ACE inhibitor	0.3750	0.013621483375959
	Antioxidative	0.1250	
EELKPTPEGNL	DPP IV inhibitor	0.4545	7.4149246879238E-5
	ACE inhibitor	0.4545	0.28854745016678
	Antioxidative	0.3636	
	Neuropeptide	0.0909	
AMAASDISLL	DPP IV inhibitor	0.5000	5.0366870673818E-5
	ACE inhibitor	0.1000	0.00016129032258065
YSLAMAASD	DPP IV inhibitor	0.6667	5.5963189637575E-5
	ACE inhibitor	0.3333	0.00064225880701186
VRTPEVDKEALE KFDKA	DPP IV inhibitor	0.5294	0.00019037825297283
	ACE inhibitor	0.5882	0.005495178051798
VRTPEVDKEALE KFDKALKALPM HIRL	DPP IV inhibitor	0.6667	0.00022537408831487
	ACE inhibitor	0.7407	0.01053359115468
	Antioxidative	0.1852	
	Neuropeptide	0.0741	
ISLLDAQSAPLR V	DPP IV inhibitor	0.3846	4.0236299348984E-5
	ACE inhibitor	0.3846	0.0011907265468058
LEKFDKALKALP MHIRL	DPP IV inhibitor	0.7059	0.00019523720543846
	ACE inhibitor	0.8824	0.015405891815114
	Antioxidative	0.2941	
	Neuropeptide	0.1176	
LDAQSAPLRV	DPP IV inhibitor	0.3000	1.2578616352201E-5
	ACE inhibitor	0.5000	0.0015479445108475
IQKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.6250	0.0022310814482712
	ACE inhibitor	0.2500	0.00071630380341309
	Antioxidative	0.2500	
KVAGTW	DPP IV inhibitor	0.6667	0.0029747752643616
	ACE inhibitor	0.6667	0.00076674782074664
	Antioxidative	0.3333	
MKGLDIQKVAG TW	DPP IV inhibitor	0.6154	0.001402388952072
	ACE inhibitor	0.7692	0.0062237294039741
	Antioxidative	0.1538	

	Neuropeptide	0.0769	
QKVAGTW	DPP IV inhibitor	0.5714	0.0025498073694528
	ACE inhibitor	0.7143	0.00081863291818639
	Antioxidative	0.2857	
KFDKALKALPM HIRL	DPP IV inhibitor	0.7333	0.00020054398114247
	ACE inhibitor	0.8667	0.017376089945011
	Antioxidative	0.3333	
	Neuropeptide	0.1333	
VEELKPTPEGNL EIL	DPP IV inhibitor	0.5333	5.4376114378108E
	ACE inhibitor	0.5333	0.2128146875988
	Antioxidative	0.2667	
	Neuropeptide	0.0667	
KALPMHIRL	DPP IV inhibitor	0.8889	0.00019056114696706
	ACE inhibitor	1.0000	0.0081490972746961
	Antioxidative	0.4444	
	Neuropeptide	0.2222	
TQTMKGLD	DPP IV inhibitor	0.7500	4.7800598845902E-5
	ACE inhibitor	0.5000	0.0018287980601949
	Neuropeptide	0.1250	
NENKVLVLDTD YKKYLL	DPP IV inhibitor	0.7059	0.0017284290999432
	ACE inhibitor	0.4706	0.010722358670151
	Antioxidative	0.3529	
	Neuropeptide	0.0588	
YSLAMAASDISL	DPP IV inhibitor	0.5833	7.5079536229413E-5
	ACE inhibitor	0.2500	0.00048169410525889
PTPEGNL	DPP IV inhibitor	0.5714	6.0277275467149E-5
	ACE inhibitor	0.4286	0.00050962948286111
YVEELKPTPEGN LE	DPP IV inhibitor	0.5000	5.8260122547973E-5
	ACE inhibitor	0.5000	0.22683999094861
	Antioxidative	0.4286	
	Neuropeptide	0.0714	
ALEKFDKALKA LPMHIRL	DPP IV inhibitor	0.7222	0.00024736956965075
	ACE inhibitor	0.8333	0.014550008936497
	Antioxidative	0.2778	
	Neuropeptide	0.1111	
DTDYKKYLL	DPP IV inhibitor	0.6667	
	ACE inhibitor	0.5556	0.010965292670086
	Antioxidative	0.5556	
	Neuropeptide	0.1111	
	DPP IV inhibitor	0.5200	3.7657115167745E-5

DAQSAPLRVYV EELKPTPEGNLEI L	ACE inhibitor	0.6400	0.13721979351848
	Antioxidative	0.3200	
	Neuropeptide	0.0400	
VTQTMKGLD	DPP IV inhibitor	0.7778	4.2489421196358E-5
	ACE inhibitor	0.4444	0.0016255982757288
	Neuropeptide	0.1111	
PMHIRL	DPP IV inhibitor	0.8333	
	ACE inhibitor	0.6667	0.00062721268806514
	Antioxidative	0.5000	
	Neuropeptide	0.3333	
RTPEVDKEALEK FDKALKALPMHI RL	DPP IV inhibitor	0.6538	0.00018748435315321
	ACE inhibitor	0.7308	0.010210291047576
	Antioxidative	0.1923	
	Neuropeptide	0.0769	

Tabela 5. Avaliação da bioatividade de WPH T2 pelo Biopep, valores de A e B

Os resultados obtidos pelo BioPep mostram que 4 sequencias derivadas de β-Lg tem maior potencial de exercer bioatividade, sendo estas KALPMHIRL: Inibição da ECA e de DPP IV (atividade anti-hipertensiva e antidiabética, respectivamente), com valores de A 1.0000 e 0.8889, respectivamente; DTDYKKYLL atividade antioxidante, com valor de A 0.5556; AFNPTQL: inibição de DPP IV, com valor de A 0.8571; PMHIRL neuropeptídeo, valor de A 0.3333 e DTDYKKYLLF efeito opioide, valor de A 0.1000. Estas sequencias também apresentaram score no PeptideRanker acima de 0,5 e suas estruturas químicas foram obtidas pelo Pep draw (Figura 9 A-E)



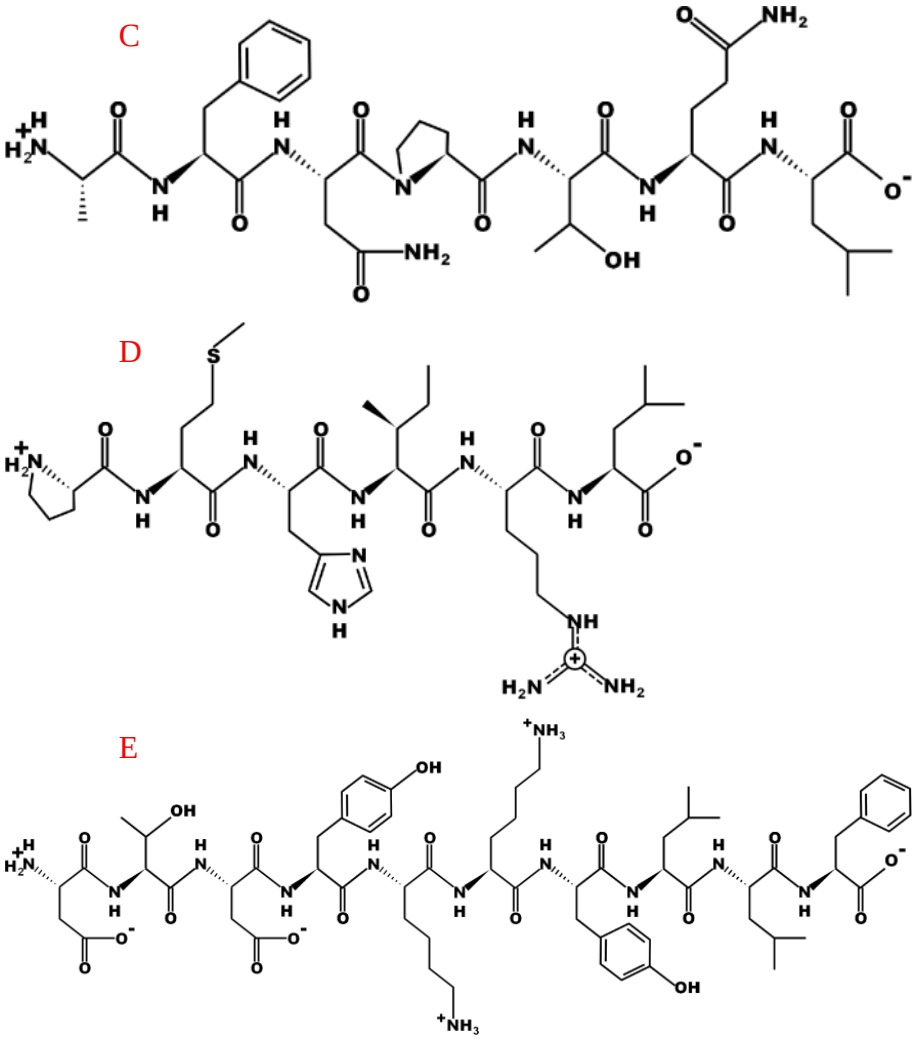


Figura 9. Estrutura química das sequências KALPMHIRL (A): DTDYKKYLL (B) AFNPTQL (C); PMHIRL (D) e DTDYKKYLLF (E)

3.10. Avaliação do efeito ansiolítico do hidrolisado do soro do leite caprino

O peixe-zebra (Zfa) possui um repertório comportamental rico e bem caracterizado [89] motivo pelo qual esse modelo *in vivo* foi utilizado para analisar o efeito do hidrolisado do soro do leite caprino (com 150 min de hidrólise) no comportamento ansiolítico e anticonvulsivante. Quanto a toxicidade do hidrolisado, nenhuma das diferentes doses administradas (4, 20 e 40 mg.kg) foram tóxicas para os Zfa em até 96 h de análise (DL50 > 40 mg.kg), pois não houve morte e nenhuma alteração anatômica aparente nos animais durante este período ($p > 0,05$). Estes resultados corroboram com aqueles preditos no ToxinPred. Assim, a atividade locomotora dos animais foi avaliada uma vez que esta técnica é muito utilizada para medir o nível de excitabilidade do sistema nervoso central (SNC), onde a diminuição da locomoção é resultado da depressão do SNC (Öztürk et al., 1996). Fármacos ansiolíticos como os benzodiazepínicos são relatados como responsáveis por reduzir a locomoção de Zebrafish adulto no teste de campo aberto e por isso foi usado Diazepan (DZP) como controle positivo e os resultados podem ser visualizados na figura 10 [47,51].

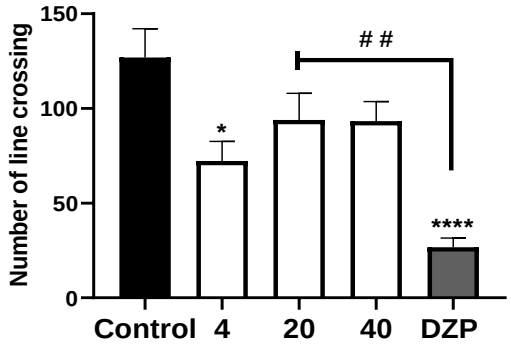


Figura. 10. Efeito do peptídeo sob o comportamento locomotor do peixe-zebra adulto no Teste de Campo Aberto (0–5 min).

Ocorreu redução da locomoção dos peixes tratados com a menor dose (4mg.kg) do hidrolisado e os animais tiveram a atividade locomotora significativamente reduzida quando comparados com os grupos controle negativo (DMSO a 3 %), não havendo influência do aumento da dose no comprometimento motor (Fig. 12).

Para avaliação ansiolítica utilizou-se o paradigma claro-escuro (Fig 11 A), um teste pré-clínico frequentemente empregado para triagem de drogas ansiolíticas que observa a tendência dos animais apresentarem ansiedade inata de escapar de um compartimento bem iluminado para um compartimento escuro, uma resposta antipredatória natural adaptativa induzida e observada facilmente em Zfa adulto no aquário, similar ao que ocorre em roedores [90,91].

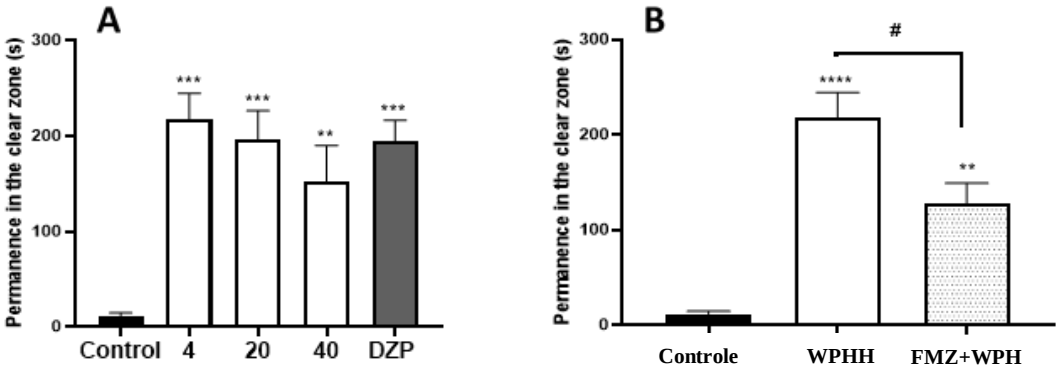


Figura 11. Efeito do hidrolisado na ansiedade do Zfa no teste claro/escuro (0–5 min). (B) Efeito do flumazenil sob o comportamento ansiolítico dos animais tratados com WPH T2 (4, 20 e 40 mg.kg) no teste claro/escuro.

Para o teste claro/escuro o hidrolisado ocasionou comportamento ansiolítico em todas as doses testadas, pois nos animais tratados estes permaneceram na área clara do aquário demonstrando um comportamento semelhante ao dos animais do grupo controle positivo ($p > 0,05$). Houve uma diferença com relação ao efeito dose-dependente, o grupo com a menor dose administrada (4 mg/kg) ocasionou maior efeito ansiolítico (Fig. 11 A) sendo este até ligeiramente maior do que o efeito do DZP, diante disso a menor concentração foi escolhida para os experimentos posteriores.

Investigou-se então o mecanismo de ação via complexo receptor GABAA - Benzodiazepina utilizando o flumazenil como antagonista (Fig. 11-B). O flumazenil é responsável por antagonizar os efeitos dos benzodiazepínicos e tem um perfil de seletividade

na subunidade α semelhante ao DZP no receptor GABAA [92]. O pré-tratamento com flumazenil reverteu o comportamento ansiolítico dos animais tratados com o hidrolisado, demonstrando que o efeito ansiolítico pode ocorrer através da interação no local de ligação dos benzodiazepínicos no GABAA.

A reversão da convulsão induzida por PTZ também foi investigada (Fig. 12 A e B). O hidrolisado e o DZP aumentaram o tempo de latência para o aparecimento das crises induzidas por PTZ, principalmente nos estágios dois e três que são comportamentos semelhante ao clônico (principal fenótipo convulsivo medido). Quando comparado ao controle (DZP) o hidrolisado retardou significativamente as crises induzidas por PTZ nos estágios I (aumento drástico da atividade natatória e estágio) e II (comportamento em redemoinho) da convulsão. Além disso, o pré-tratamento com flumazenil bloqueou o efeito anticonvulsivante do hidrolisado nos três estágios, indicando que esse efeito também pode estar implicado no local de ligação dos benzodiazepínicos no receptor GABAA.

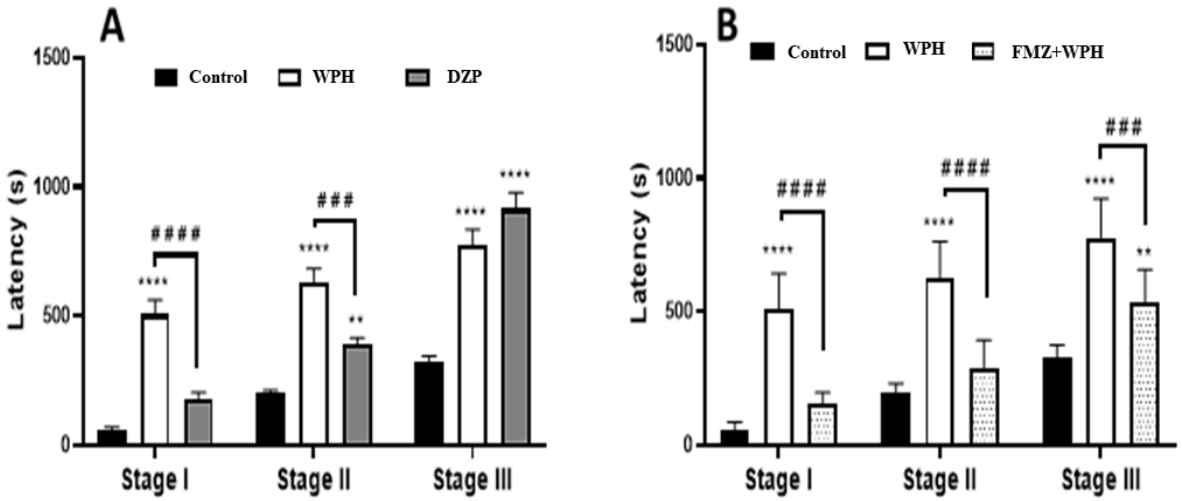


Figura 12. (A) Efeito do hidrolisado na convulsão induzida por pentilenotetrazol em peixes-zebra adultos. (B) Efeito do flumazenil (Fmz) na ação anticonvulsivante de WPH T2.

O peixe-zebra é utilizado como modelo animal para crises convulsivas por apresentar regiões cerebrais totalmente desenvolvidas, com neurotransmissores e barreira hematoencefálica cruciais na epileptogênese [93]. Estudos indicam que peixes-zebra com ansiedade elevada apresentam maior suscetibilidade às crises evocadas por PTZ, que desencadeia convulsões devido ao antagonismo que exerce dos receptores GABAA no sistema nervoso central [94,95].

O efeito ansiolítico observado do hidrolisado das proteínas do soro do leite pode estar relacionado aos aminoácidos tirosina e triptofano que são precursores de neurotransmissores cerebrais. Um aumento nas concentrações sanguíneas destes podem levar a maior síntese e liberação de, respectivamente, catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina) e de serotonina (5-hidroxitriptamina), uma molécula que desempenha um importante papel na regulação do sono, no humor, na cognição e na ansiedade [96,97]. As proteínas β-Lg e α-La, presentes no soro do leite, contém altos níveis de tirosina e triptofano e vem sendo reportadas por desempenharem um importante papel a nível neurológico [97,98].

O efeito neurológico destas proteínas pode estar relacionado a produção de serotonina no epitélio gastrointestinal resultando em uma modulação hipotalâmica por parte destes

neuropeptideos, reforçando seu efeito no eixo microbiota-intestino cérebro. Dentre as sequências de peptídeos identificadas no hidrolisado, a busca no BioPep retornou 32 sequencias com potencial efeito como neuropeptídeo, o que corresponde a mais de 50% do total de sequências identificadas. No que concerne aos resíduos de triptofano e tirosina, 16 sequencias exibem resíduos de triptofano em sua maior na porção N-terminal e 14 sequências apresentam resíduos de tirosina explicando assim o efeito ansiolítico observado no modelo Zebrafish.

4. CONCLUSÃO

A modificação dos parâmetros da atividade enzimática melhorou as características dos hidrolisados da proteína do soro do leite caprino mostrando que a otimização do processamento foi útil para de produzir peptídeos com propriedades tecnológicas e bioativas de grande interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica, sendo assim um processo que pode ser utilizado em maior escala para produção de bioativos. Os hidrolisados obtidos apresentaram proteínas potencialmente bioativas, com boa solubilidade, contendo aminoácidos que desempenham um papel fisiológico importante. O hidrolisado do soro do leite caprino demonstrou um efeito antioxidante que levou a diminuição da ansiedade quando testado no modelo zebra-fish. Essas atividades biológicas reforçam o efeito funcional dos hidrolisados e traz uma nova perspectiva dentro de um modelo *in vivo* não usual para prospectar o hidrolisado da proteína do soro do leite caprino como um ansiolítico natural. Os resultados obtidos pelas análises *in sílico* reafirmam a obtenção de peptídeos bioativos pela hidrólise, onde 4 sequencias potencialmente bioativas foram identificadas sendo estas, KALPMHIRL: (atividade anti-hipertensiva e antidiabética, respectivamente), DTDYKKYLL atividade antioxidante, AFNPTQL antidiabética; PMHIRL neuropeptídeo e DTDYKKYLLF com efeito opióides. Assim a partir dos resultados deste trabalho podemos prospectar a utilização dos hidrolisados do soro do leite como um ingrediente alimentar e/ou nutracêutico, fomentando a produção do leite caprino para este fim e reaproveitando um subproduto para geração de renda e comercialização. Novas estratégias podem ser desenhadas a partir dos dados para que se venha a estudar aplicações dos hidrolisados do soro do leite caprino e assim inseri-los no mercado de produtos bioativos.

CRediT authorship contribution statement Maria Isabel Ferreira Campos: Formal analysis, Investigation, Data curation, Methodology, Investigation, Writing-original draft, Conceptualization, Writing– review & editing, Ana Karolina de Sousa Lima: Formal analysis, Investigation, Data curation, José Honório Pereira Lopes Neto: Formal analysis, Investigation, Data curation, Júlia Mariano Caju: Formal analysis, Investigation, Data curation; Antonio Wlisses da Silva: Formal analysis, Investigation, Data curation, Maria Kueirislene Amâncio Ferreira: Formal analysis, Investigation, Data curation, Jackson Gabriel Miyamoto: Formal analysis, Investigation, Data curation, Carlos Alberto de Almeida Gadelha: Project administration, Methodology, Hélcio Silva dos Santos: Methodology, Emmanuel Silva Marinho: Methodology, Alexandre Keiji Tashima: Methodology, Data curation, Tatiane Santi Gadelha: Project administration, Supervision, Writing– review & editing, Funding acquisition.

Founding: Este trabalho foi financiado pelo Instituto de desenvolvimento em pesquisa- IDEP da Universidade Federal da Paraíba e pela Coordenação de aperfeiçoamento pessoal CAPES a partir da concessão de bolsas de estudo

Declaration of competing interest: Os autores declaram que não há conflito de interesses

REFERÊNCIAS

[1] V. Gallo, F. Giansanti, A. Arienzo, G. Antonini, Antiviral properties of whey proteins and their activity against SARS-CoV-2 infection, J. Funct. Foods. 89 (2022) 104932. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104932.

[2] Z. Zhao, X. Sun, N. Liu, J. Cheng, C. Wang, M. Guo, Comparative analysis of caseins in Saanen goat milk from 3 different regions of China using quantitative proteomics, J. Dairy Sci. (2022). https://doi.org/10.3168/jds.2021-21659.

[3] X. Chen, R. Zheng, R. Liu, L. Li, Goat milk fermented by lactic acid bacteria modulates small intestinal microbiota and immune responses, J. Funct. Foods. 65 (2020) 103744. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103744.

[4] B.B. Aragão, S.C. Trajano, R.P. de Oliveira, D.M. Sobral da Silva, R.G. de Carvalho, M.A. Juliano, J.W. Pinheiro Junior, R.A. Mota, Multiresistant zoonotic pathogens isolated from goat milk in Northeastern Brazil, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 79 (2021) 101701. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101701.

[5] M. Dybdahl, D.B. Selesko, U.R. Mikkelsen, Safety evaluation of whey derived beta-lactoglobulin, Lacprodan® BLG, Toxicol. Reports. 8 (2021) 617–626. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.012.

[6] M.I.F. Campos, P.P. de S. Barbosa, L.J. Camargo, L.D.S. Pinto, B. Mataribu, C. Serrão, L.F. Marques-Santos, J.H. Lopes, J.M.C. de Oliveira, C.A. de A. Gadelha, T. Santi-Gadelha, Characterization of goat whey proteins and their bioactivity and toxicity assay, Food Biosci. 46 (2022) 101591. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101591.

[7] X. Du, H. Jing, L. Wang, X. Huang, X. Wang, H. Wang, Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases, LWT. 159 (2022) 113257. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113257.

[8] J. Su, A. Cavaco-Paulo, Effect of ultrasound on protein functionality, Ultrason. Sonochem. 76 (2021) 105653. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105653.

[9] S. Minj, S. Anand, Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications, Dairy. 1 (2020) 233–258. https://doi.org/10.3390/dairy1030016.

[10] V. Popescu, A. Molea, M. Moldovan, P.M. Lopes, A. Mazilu Moldovan, G.L. Popescu, The Influence of Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins on the Properties of Gelatin-Whey Composite Hydrogels, Materials (Basel). 14 (2021) 3507. https://doi.org/10.3390/ma14133507.

[11] F.S. Fajardo-Espinoza, C. Ordaz-Pichardo, U. Sankar, A. Romero-Rojas, M.A. Moreno-

Eutimio, H. Hernández-Sánchez, In vitro cytomodulatory and immunomodulatory effects of bovine colostrum whey protein hydrolysates, Int. J. Food Sci. Technol. 56 (2021) 2109–2121. https://doi.org/10.1111/ijfs.14767.

[12] M.B. Ballatore, M. del R. Bettiol, N.L. Vanden Braber, C.A. Aminahuel, Y.E. Rossi, G. Petroselli, R. Erra-Balsells, L.R. Cavaglieri, M.A. Montenegro, Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin, Food Chem. 319 (2020) 126472. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472.

[13] O. Alizadeh, J. Aliakbarlu, Effects of ultrasound and ohmic heating pretreatments on hydrolysis, antioxidant and antibacterial activities of whey protein concentrate and its fractions, LWT. 131 (2020) 109913. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109913.

[14] Y. Chamata, K.G. Jackson, K.A. Watson, P. Jauregi, Whey-derived peptides at the heart of the covid-19 pandemic, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021). https://doi.org/10.3390/ijms222111662.

[15] P. Mudgil, M. AlMazroui, A.A. Redha, B.P. Kilari, S. Srikumar, S. Maqsood, Cow and camel milk-derived whey and casein protein hydrolysates demonstrated effective antifungal properties against selected Candida species, J. Dairy Sci. 105 (2022) 1878–1888. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20944.

[16] W.N. Baba, B. Baby, P. Mudgil, C.-Y. Gan, R. Vijayan, S. Maqsood, Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides, LWT. 143 (2021) 111135. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111135.

[17] C. Feng, L. Tian, H. Hong, Q. Wang, X. Zhan, Y. Luo, Y. Tan, In Vitro Gut Fermentation of Whey Protein Hydrolysate: An Evaluation of Its Potential Modulation on Infant Gut Microbiome, Nutrients. 14 (2022) 1374. https://doi.org/10.3390/nu14071374.

[18] I.U. Okagu, T.P.C. Ezeorba, E.C. Aham, R.N. Aguchem, R.N. Nechi, Recent findings on the cellular and molecular mechanisms of action of novel food-derived antihypertensive peptides, Food Chem. Mol. Sci. 4 (2022) 100078. https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100078.

[19] Z. Hafeez, S. Benoit, C. Cakir-Kiefer, A. Dary, L. Miclo, Food protein-derived anxiolytic peptides: their potential role in anxiety management, Food Funct. 12 (2021) 1415–1431. https://doi.org/10.1039/D0FO02432E.

[20] M.A. de Souza, K.K.A. de Castro, F.W.Q. Almeida-Neto, P.N. Bandeira, M.K.A. Ferreira, M.M. Marinho, M.N. da Rocha, D.H.A. de Brito, F.R. da S. Mendes, T.H.S.

Rodrigues, M.R. de Oliveira, J.E.S.A. de Menezes, A.C.H. Barreto, E.S. Marinho, P. de Lima-Neto, H.S. dos Santos, A.M.R. Teixeira, Structural and spectroscopic analysis, ADMET study, and anxiolytic-like effect in adult zebrafish (Danio rerio) of 4′-[(1E,2E)-1-(2-(2′,4′-dinitrophenyl)hydrazone-3-(4-methoxyphenyl)allyl)aniline, J. Mol. Struct. 1251 (2022) 132064. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132064.

[21] N.G.G. Gonçalves, J.I.F. de Araújo, F.E.A. Magalhães, F.R.S. Mendes, M.D.P. Lobo, A.C. de O.M. Moreira, R. de A. Moreira, Protein fraction from Artocarpus altilis pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotoninergic system, J. Funct. Foods. 66 (2020) 103772. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103772.

[22] A. Facciol, S. Tran, R. Gerlai, Re-examining the factors affecting choice in the light–dark preference test in zebrafish, Behav. Brain Res. 327 (2017) 21–28. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.040.

[23] M.H. Abd El-Salam, S. El-Shibiny, Glycation of whey proteins: Technological and nutritional implications, Int. J. Biol. Macromol. 112 (2018) 83–92. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.114.

[24] Q. Cui, Y. Sun, J. Cheng, M. Guo, Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate, Food Chem. 366 (2022) 130711. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130711.

[25] AOAC., Official Methods of Analysis of AOAC International., 2016.

[26] M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 254 (1976) 248–254.

[27] Y. Li, Y. Fan, J. Liu, Z. Meng, A. Huang, F. Xu, X. Wang, Identification, characterization and in vitro activity of hypoglycemic peptides in whey hydrolysates from rubing cheese by-product, Food Res. Int. 164 (2023) 112382. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112382.

[28] L. Salelles, J. Floury, S. Le Feunteun, Pepsin activity as a function of pH and digestion time on caseins and egg white proteins under static in vitro conditions, Food Funct. 12 (2021) 12468–12478. https://doi.org/10.1039/D1FO02453A.

[29] A.S. Ahmed, T. El-Bassiony, L.M. Elmalt, H.R. Ibrahim, Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins, Food Res. Int. 74 (2015) 80–88. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032.

[30] A.R. Tondo, L. Caputo, G.F. Mangiatordi, L. Monaci, G. Lentini, A.F. Logrieco, M.

Montaruli, O. Nicolotti, L. Quintieri, Structure-Based Identification and Design of Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Whey Proteins, J. Agric. Food Chem. 68 (2020) 541–548. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06237.

[31] M.P.C. Silvestre, H.A. Morais, V.D.M. Silva, M.R. Silva, Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin, Nutrire. 38 (2013) 278–290. https://doi.org/10.4322/nutrire.2013.026.

[32] D. Spellman, E. McEvoy, G. O'Cuinn, R.J. FitzGerald, Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis, Int. Dairy J. 13 (2003) 447–453. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0.

[33] S. Lie, THE EBC-NINHYDRIN METHOD FOR DETERMINATION OF FREE ALPHA AMINO NITROGEN, J. Inst. Brew. 79 (1973) 37–41. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x.

[34] S. Martini, R. Potter, M.K. Walsh, Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions, Food Res. Int. 43 (2010) 2444–2451. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.018.

[35] Z. Shahi, S.Z. Sayyed-Alangi, L. Najafian, Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake, Heliyon. 6 (2020) e03365. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03365.

[36] C.V. MORR, B. GERMAN, J.E. KINSELLA, J.M. REGENSTEIN, J.P. VAN BUREN, A. KILARA, B.A. LEWIS, M.E. MANGINO, A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure, J. Food Sci. 50 (1985) 1715–1718. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x.

[37] H. Schägger, G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, Anal. Biochem. 166 (1987) 368–379. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2.

[38] A. Hintoiu, G. Rapeanu, S. Stanciu, N. Stanciuc, The effect of pH and thermal treatment on some functional properties of whey proteins hydrolysates as measured by fluorescence spectroscopy., J. Agroaliment. Process. Technol. 17 (2011) 179–185. http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ffh&AN=2012-04-Pn0707&lang=pt-br&site=ehost-live&authtype=ip,cookie,uid.

[39] Q. Cui, L. Wang, G. Wang, A. Zhang, X. Wang, L. Jiang, Ultrasonication effects on physicochemical and emulsifying properties of Cyperus esculentus seed (tiger nut)

proteins, Lwt. 142 (2021) 110979. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110979.

[40] T.K.A. Bezerra, J.T.J.G. de Lacerda, B.R. Salu, M.L.V. Oliva, M.A. Juliano, M.T.B. Pacheco, M.S. Madruga, Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory and Anticoagulant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Chicken Combs and Wattles, J. Med. Food. 22 (2019) 1294–1300. https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0066.

[41] F. Ostertag, C.M. Schmidt, S. Berensmeier, J. Hinrichs, Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins, Food Chem. 342 (2021) 128176. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128176.

[42] M. do S.M. Rufino, R.E. Alves, E.S. de Brito, S.M. de Morais, C. de G. Sampaio, J. Pérez-Jiménez, F.D. Saura-Calixto, Embrapa - Cot_127, Embrapa. (2007) 1–4. https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf.

[43] F.J. Morales, S. Jiménez-Pérez, Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence, Food Chem. 72 (2001) 119–125. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00239-9.

[44] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, Nat. Protoc. 2 (2007) 1896–1906. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261.

[45] A. Simizo, E.S. Kitano, S.S. Sant'Anna, K.F. Grego, A.M. Tanaka-Azevedo, A.K. Tashima, Comparative gender peptidomics of Bothrops atrox venoms: are there differences between them?, J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 26 (2020). https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0055.

[46] C. Mooney, N.J. Haslam, G. Pollastri, D.C. Shields, Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity, PLoS One. 7 (2012) e45012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045012.

[47] S. Gupta, P. Kapoor, K. Chaudhary, A. Gautam, R. Kumar, G.P.S. Raghava, In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins, PLoS One. 8 (2013) e73957. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957.

[48] Minkiewicz, Iwaniak, Darewicz, BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 5978. https://doi.org/10.3390/ijms20235978.

[49] E.R. Coscueta, P. Batista, J.E.G. Gomes, R. da Silva, M.M. Pintado, Screening of Novel Bioactive Peptides from Goat Casein: In Silico to In Vitro Validation, Int. J. Mol. Sci.

23 (2022) 2439. https://doi.org/10.3390/ijms23052439.

[50] M. Tu, C. Wang, C. Chen, R. Zhang, H. Liu, W. Lu, L. Jiang, M. Du, Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms, Food Chem. 256 (2018) 98–104. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.107.

[51] K.M. Ferreira, Amâncio, A. Wlisses, A. Lucas, K. Vanessa, B. Sales, E. Machado, N. Martins, M. Machado, P. Nogueira, F. Ernani, A. Magalhães, E. Silva, J. Eire, S. Alencar, D. Menezes, H. Silva, Epilepsy & Behavior Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish, 117 (2021). https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107881.

[52] Oecd, Fish, acute toxicity test., in: Guidel. Test. Chem., 1992: pp. 1–9.

[53] D.L. Gebauer, N. Pagnussat, Â.L. Piato, I.C. Schaefer, C.D. Bonan, D.R. Lara, Pharmacology , Biochemistry and Behavior Effects of anxiolytics in zebra fi sh : Similarities and differences between benzodiazepines , buspirone and ethanol ☆, 99 (2011) 480–486. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.021.

[54] C.K. Benneh, R.P. Biney, P.K. Mante, A. Tandoh, D.W. Adongo, E. Woode, Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems, J. Ethnopharmacol. 207 (2017) 129–145. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.012.

[55] A.M. Siebel, F.P. Menezes, K.M. Capiotti, L.W. Kist, I. da C. Schaefer, J.Z. Frantz, M.R. Bogo, R.S. Da Silva, C.D. Bonan, Role of Adenosine Signaling on Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Zebrafish, Zebrafish. 12 (2015) 127–136. https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1004.

[56] R. Chourasia, L.C. Phukon, M.M. Abedin, S. Padhi, S.P. Singh, A.K. Rai, Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products, Bioresour. Technol. Reports. 19 (2022) 101144. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144.

[57] S.Z. Bustamante, J.G. González, S. Sforza, T. Tedeschi, Bioactivity and peptide profile of whey protein hydrolysates obtained from Colombian double-cream cheese production and their products after gastrointestinal digestion, LWT. 145 (2021) 111334. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111334.

[58] C. Baldasso, T.C. Barros, I.C. Tessaro, Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration, Desalination. 278 (2011) 381–386. https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055.

[59] T. Bezerra, M. Estévez, J.T. Lacerda, M. Dias, M. Juliano, M.A. Mendes, M. Morgano,

M.T. Pacheco, M. Madruga, Chicken Combs and Wattles as Sources of Bioactive Peptides: Optimization of Hydrolysis, Identification by LC-ESI-MS2 and Bioactivity Assessment, Molecules. 25 (2020) 1698. https://doi.org/10.3390/molecules25071698.

[60] D.A.S. Lima, M.M.F. Santos, R.L.F. Duvale, T.K.A. Bezerra, Í.B. da S. Araújo, M.S. Madruga, F.A.P. da Silva, Technological properties of protein hydrolysate from the cutting byproduct of serra spanish mackerel (Scomberomorus brasiliensis), J. Food Sci. Technol. 58 (2021) 2952–2962. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04797-5.

[61] F.A. Hussein, S.Y. Chay, M. Zarei, S.M. Auwal, A.A. Hamid, W.Z. Wan Ibadullah, N. Saari, Whey Protein Concentrate as a Novel Source of Bifunctional Peptides with Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Properties: RSM Study, Foods. 9 (2020) 64. https://doi.org/10.3390/foods9010064.

[62] R. Kankanamge, C. Jeewanthi, N.-K. Lee, S.-K. Lee, Y.C. Yoon, H.-D. Paik, Physicochemical characterization of hydrolysates of whey protein concentrates for their use in nutritional beverages, Food Sci. Biotechnol. 24 (2015) 1335–1340. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0171-3.

[63] J. Morales García, F. Herrera-Rocha, A.S. Cavajalino, R. Duran Baron, A.F. González Barrios, C.C. Udenigwe, Effects of processing conditions on hydrolysates of proteins from whole whey and formation of Maillard reaction products, J. Food Process. Preserv. 45 (2021) 1–10. https://doi.org/10.1111/jfpp.15469.

[64] H. Kamal, S. Jafar, P. Mudgil, C. Murali, A. Amin, S. Maqsood, Inhibitory properties of camel whey protein hydrolysates toward liver cancer cells, dipeptidyl peptidase-IV, and inflammation, J. Dairy Sci. 101 (2018) 8711–8720. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14586.

[65] A. Kheroufi, M.E. Brassesco, D.A. Campos, A. Mouzai, H. Boughellouta, M.E. Pintado, Whey protein-derived peptides: The impact of chicken pepsin hydrolysis upon whey proteins concentrate on their biological and technological properties, Int. Dairy J. 134 (2022) 105442. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105442.

[66] K. Sarabandi, A. Sadeghi Mahoonak, H. Hamishekar, M. Ghorbani, S.M. Jafari, Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties, J. Food Eng. 237 (2018) 86–95. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.036.

[67] C. Mellinger-Silva, L.O.L. Rosa, M.P. Stephan, A.I.S. Brígida, L.M.C. Cabral, G.O. da Silva, K.L. Guarido, D.M. Gomes, J.E. da Silva-Santos, Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate, Int. Dairy J. 48 (2015) 73–79.

https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.016.

[68] A.M. Lermen, N.J. Clerici, D. Borchartt Maciel, D.J. Daroit, Characterization and application of a crude bacterial protease to produce antioxidant hydrolysates from whey protein, Prep. Biochem. Biotechnol. 53 (2023) 12–21. https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033997.

[69] J. Li, Z. Yang, X. Lin, S. Wu, G. Li, N. Li, D. Otter, F. Zhu, C. Hartinger, H. Corke, Y. Hemar, In-flow SAXS investigation of whey protein isolate hydrolyzed by bromelain, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 631 (2021) 127662. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127662.

[70] T.P. Singh, R.A. Siddiqi, D.S. Sogi, Statistical optimization of enzymatic hydrolysis of rice bran protein concentrate for enhanced hydrolysate production by papain, LWT. 99 (2019) 77–83. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.014.

[71] A. Bhimrao Muley, A. Bhalchandra Pandit, R. Satishchandra Singhal, S. Govind Dalvi, Production of biologically active peptides by hydrolysis of whey protein isolates using hydrodynamic cavitation, Ultrason. Sonochem. 71 (2021) 105385. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105385.

[72] Z. Karami, B. Akbari-adergani, Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties, J. Food Sci. Technol. 56 (2019) 535–547. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4.

[73] A. Kheroufi, M.E. Brassesco, D.A. Campos, H. Boughellout, M.E. Pintado, Functional properties of peptides obtained from whey proteins by ficin extract hydrolysis, Food Biosci. 47 (2022) 101707. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101707.

[74] C. Jeewanthi, H.-D. Paik, M.-H. Kim, N.-K. Lee, S.-Y. Kim, C. Yoon, Characteristics of whey proteinhydrolysates from cheese whey, favors onvarious food applications, Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 20 (2014) 503–509. https://doi.org/10.2298/CICEQ130221032J.

[75] A.A. Tokmakov, A. Kurotani, K.-I. Sato, Protein pI and Intracellular Localization, Front. Mol. Biosci. 8 (2021). https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.775736.

[76] C.H. Mansinhbhai, A. Sakure, R. Maurya, M. Bishnoi, K.K. Kondepudi, S. Das, S. Hati, Significance of whey protein hydrolysate on anti-oxidative, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities and release of peptides with biofunctionality: an in vitro and in silico approach, J. Food Sci. Technol. 59 (2022) 2629–2642. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05282-3.

[77] C. Hinnenkamp, B.P. Ismail, A proteomics approach to characterizing limited hydrolysis

of whey protein concentrate, Food Chem. 350 (2021) 129235. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129235.

[78] R. Adjonu, G.S. Doran, P. Torley, G.O. Sampson, S.O. Agboola, Whey Protein Peptides Have Dual Functions: Bioactivity and Emulsifiers in Oil-In-Water Nanoemulsion, Foods. 11 (2022) 1812. https://doi.org/10.3390/foods11121812.

[79] C.A. Lelis, D. Galvan, L. Tessaro, J.C. de Andrade, Y.S. Mutz, C.A. Conte-Junior, Fluorescence spectroscopy in tandem with chemometric tools applied to milk quality control, J. Food Compos. Anal. 109 (2022) 104515. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104515.

[80] Z. Zheng, J. Li, J. Li, H. Sun, Y. Liu, Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes, Food Hydrocoll. 97 (2019) 105222. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105222.

[81] X. Zhang, L. Wang, Z. Chen, Y. Li, X. Luo, Y. Li, Effect of electron beam irradiation on the structural characteristics and functional properties of rice proteins, RSC Adv. 9 (2019) 13550–13560. https://doi.org/10.1039/C8RA10559F.

[82] A.L.M. de Queiroz, A.R.R. de Araújo, M.T.B. Pacheco, M.S. Madruga, Potential use of goat viscera to obtain protein hydrolysates, LWT. 84 (2017) 832–837. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.049.

[83] D. SPELLMAN, G. OCUINN, R. FITZGERALD, Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins, Food Chem. 114 (2009) 440–446. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.067.

[84] B. Jiang, J. Na, L. Wang, D. Li, C. Liu, Z. Feng, Separation and Enrichment of Antioxidant Peptides from Whey Protein Isolate Hydrolysate by Aqueous Two-Phase Extraction and Aqueous Two-Phase Flotation, Foods. 8 (2019) 34. https://doi.org/10.3390/foods8010034.

[85] J. Chandrapala, B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish, M. Ashokkumar, Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate, Ultrason. Sonochem. 18 (2011) 951–957. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.12.016.

[86] A.R. Corrochano, V. Buckin, P.M. Kelly, L. Giblin, Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways, J. Dairy Sci. 101 (2018) 4747–4761. https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13618.

[87] B.H. Sarmadi, A. Ismail, Antioxidative peptides from food proteins: A review, Peptides. 31 (2010) 1949–1956. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020.

[88] X. Zhu, D. Xie, Q. Zhu, Y. Li, C. Cui, Preparation of β-lactoglobulin-derived tryptophan peptide and its effect on anxiety-like behaviors in Zebrafish, Front. Nutr. 9 (2023). https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1100718.

[89] A. V. Kalueff, M. Gebhardt, A.M. Stewart, J.M. Cachat, M. Brimmer, J.S. Chawla, C. Craddock, E.J. Kyzar, A. Roth, S. Landsman, S. Gaikwad, K. Robinson, E. Baatrup, K. Tierney, A. Shamchuk, W. Norton, N. Miller, T. Nicolson, O. Braubach, C.P. Gilman, J. Pittman, D.B. Rosemberg, R. Gerlai, D. Echevarria, E. Lamb, S.C.F. Neuhauss, W. Weng, L. Bally-Cuif, H. Schneider, and the Zebrafish Neuros, Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond, Zebrafish. 10 (2013) 70–86. https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861.

[90] C. Maximino, A.W.B. da Silva, A. Gouveia, A.M. Herculano, Pharmacological analysis of zebrafish (Danio rerio) scototaxis, Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. 35 (2011) 624–631. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006.

[91] M. Hascoët, M. Bourin, B.Á. Nic Dhonnchadha, The mouse ligth-dark paradigm: A review, Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. 25 (2001) 141–166. https://doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00151-2.

[92] A. Müller Herde, D. Benke, W.T. Ralvenius, L. Mu, R. Schibli, H.U. Zeilhofer, S.D. Krämer, GABAA receptor subtypes in the mouse brain: Regional mapping and diazepam receptor occupancy by in vivo [18F]flumazenil PET, Neuroimage. 150 (2017) 279–291. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.02.022.

[93] R.K. Banote, S. Koutarapu, K.S. Chennubhotla, K. Chatti, P. Kulkarni, Oral gabapentin suppresses pentylenetetrazole-induced seizure-like behavior and cephalic field potential in adult zebrafish, Epilepsy Behav. 27 (2013) 212–219. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.01.018.

[94] J. Canzian, F. Franscescon, T.E. Müller, F. V. Stefanello, T.P. Souza, L. V. Rosa, D.B. Rosemberg, Stress increases susceptibility to pentylenetetrazole-induced seizures in adult zebrafish, Epilepsy Behav. 114 (2021) 107557. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107557.

[95] and G.H. Huang, Ren-Qi; Bell-Horner, Cathy L.; Dibas, Mohammed I.; Covey, Douglas F.; Drewe, John A.; Dillon, Pentylenetetrazole-Induced Inhibition of Recombinant γ-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors: Mechanism and Site of Action, J. Pharmacol. Exp. Ther. Sept. 298 (2001) 986–995.

[96] S. Boscaini, P. Skuse, K.N. Nilaweera, J.F. Cryan, P.D. Cotter, The 'Whey' to good health: Whey protein and its beneficial effect on metabolism, gut microbiota and mental

health, Trends Food Sci. Technol. 133 (2023) 1–14. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.12.009.

[97] X. Zhu, Q. Tao, D. Sun-Waterhouse, W. Li, S. Liu, C. Cui, γ-[Glu]n-Trp ameliorates anxiety/depression-like behaviors and its anti-inflammatory effect in an animal model of anxiety/depression, Food Funct. 10 (2019) 5544–5554. https://doi.org/10.1039/C9FO01467E.

[98] Y. Ano, T. Ayabe, T. Kutsukake, R. Ohya, Y. Takaichi, S. Uchida, K. Yamada, K. Uchida, A. Takashima, H. Nakayama, Novel lactopeptides in fermented dairy products improve memory function and cognitive decline, Neurobiol. Aging. 72 (2018) 23–31. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.07.016.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1. (A) Gráfico 3-D e (B) gráfico de contorno da superfície de resposta para o grau de hidrólise em função do tempo e pH dos hidrolisados do soro do leite caprino.

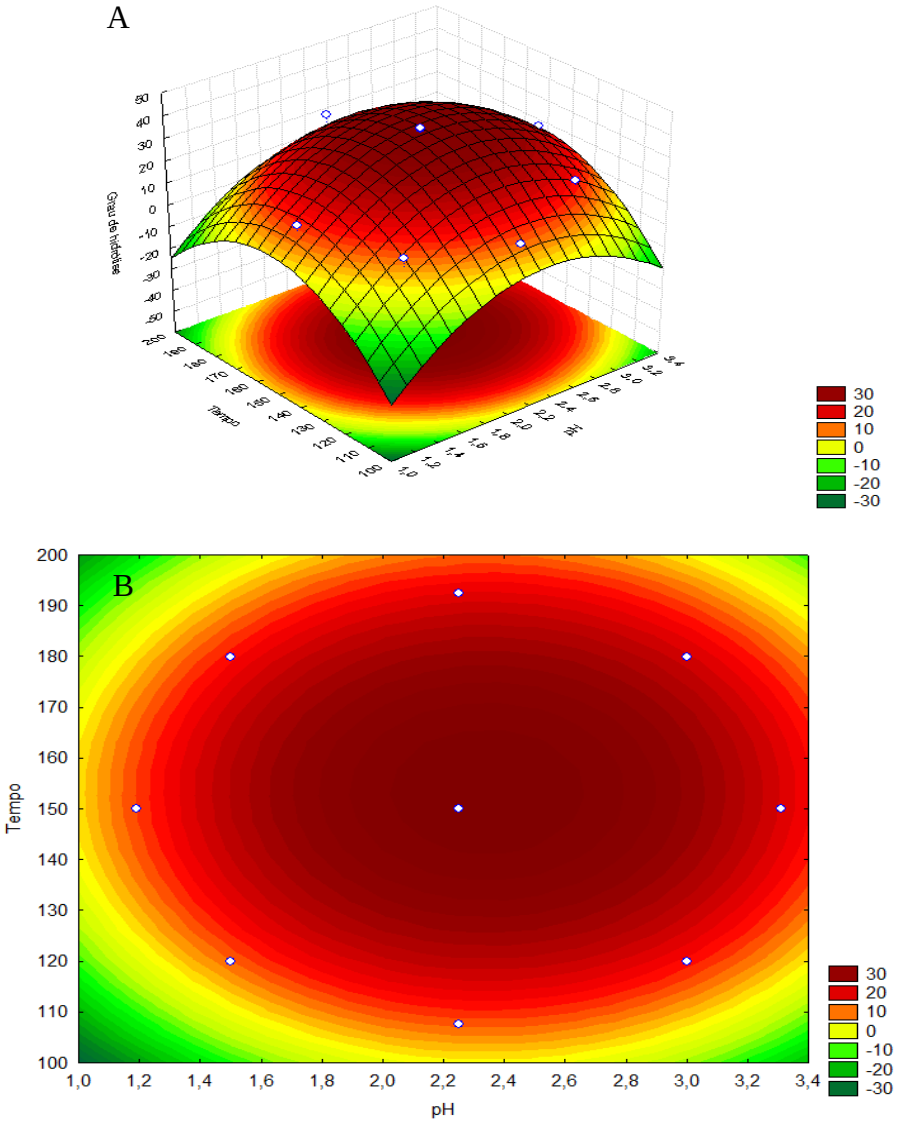


Figura 2. Gráfico de Pareto: Influência das variáveis independentes na resposta (GH)

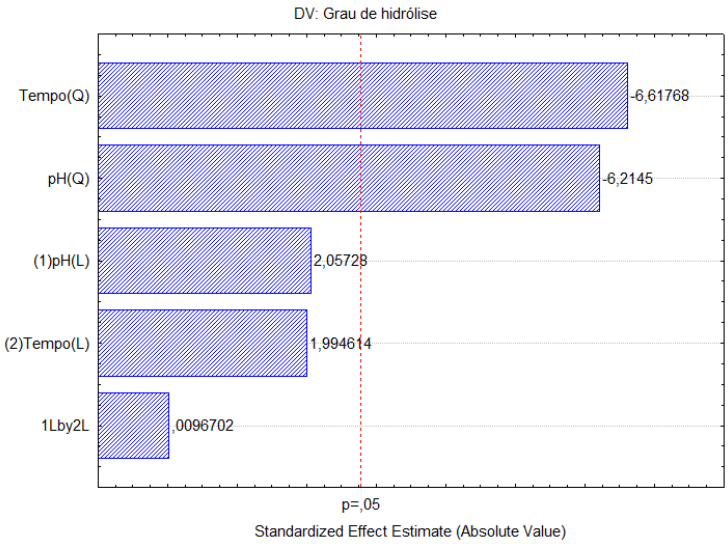


Figura 3. Valores estimados e valores preditos no modelo do planejamento estatístico.

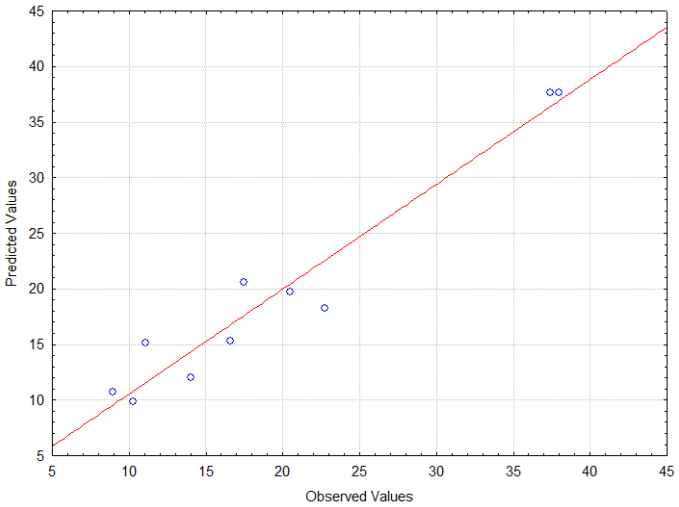


Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para análise de modelo quadrático de superfície de resposta

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Valor *f*	*f* tabelado
Regressão	925,5687	4	231,3922	20,62	5,19
Resíduo	56,1070	5	11,2214		
Falta de ajuste	55,9323	4	13,9831	80,04	224,58
Erro puro	0,1747	1	0,1747		
Total	981,6757	-	-		
R^2	0,94285	-	-	-	

SQ: Soma quadrática; GL: Grau de liberdade; QM: Quadrado médio; *f*: Teste de Fischer;

Tabela 2. Sequencias e características dos peptídeos identificados em WPH T1

Nº:Number; PI: Theoretical isoeletric point; MW: Molecular weight; Aa: Residues of amino acids; NC: Net charge; GRAVY: Grand average of hydropathy; HF: Hidrofilicity; EI: Estability Index; C: Classification

Nº	**Sequence**	**PI**	**MW**	**Aa**	**NC**	**GRAVY**	**HF**	**EI**	**C**
1	YSLAMAASDISL	3.80	1.240.601	12	0.42	1.017	0.11	19.45	Stable
2	VTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	18.749.924	17	0.76	-0.100	-0.08	-23,84	Stable
3	YVEELKPTPEGNL	4.26	14.877.507	13	0.69	-0.900	-0.16	28.82	Stable
4	YVEELKPTPEGNLEIL	4.10	18.429.614	16	0.62	-0.431	-0.09	49.36	Instable
5	EKFDKALKALPMHIRL	9.72	18.429.614	16	0.81	-0.237	-0.20	77.06	Instable
6	WWENPGVF	4.00	10.334.657	8	0.62	-0.475	0.09	5.15	Stable
7	IIVTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	21.011.606	19	0.68	0.384	0.01	-24.75	Stable
8	DKALKALPMHIRL	10.01	15.048.911	13	0.77	0.062	-0.16	83.05	Instable
9	KIDALNENKVLVL	6.42	14.678.661	13	0.77	0.331	-0.09	14.38	Stable

10	KFDKALKALPMHIRL	10.30	17.800.544	15	0.80	-0.020	-0.17	81.53	Instable
11	AFNPTQL	5.88	7.894.021	7	0.71	-0.129	-0.03	-6.31	Stable
12	TQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	1.775.924	16	0.81	-0.369	-0.11	-20.65	Stable
13	FDKALKALPMHIRL	10.01	16.519.596	14	0.71	0.257	-0.10	86.64	Instable
14	DIQKVAGTW	6.19	10.165.291	9	0.78	-0.267	-0.07	-26.68	Stable
15	ALEKFDKALKALPMHIRL	9.72	20.932.183	18	0.72	0.100	-0.13	69.61	Instable
16	YGGVSLPEW	4.00	1.006.476	9	0.44	-0.100	0.09	37.18	Stable
17	DTDYKKYLL	6.30	11.575.968	9	1.00	-1.167	-0.30	-7.81	Stable
18	LEKFDKALKALPMHIRL	9.72	20.221.812	17	0.76	0.000	-0.16	73.12	Instable
19	LKDYGGVSLPEW	4.38	13.626.819	12	0.58	-0.375	-0.04	23.31	Stable
20	NEPEDETHL	4.00	10.824.517	9	0.89	-2.133	-0.37	71.00	Instable
21	VRTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIRL	8.76	31.467.637	27	0.85	-0.407	-0.24	47.47	Instable

22	LDIQKVAGTW	6.19	11.296.132	10	0.70	0.140	-0.01	-23.01	Stable
23	KPTPEGNL	6.35	8.544.498	8	0.75	-1.425	-0.25	10.44	Stable
24	QTMKGLDIQKVAGTW	8.94	16.748.763	15	0.80	-0.347	-0.11	-17.67	Stable
25	QSAPLRVYVEELKPTPEGNL	4.79	22.391.848	20	0.80	-0.615	-0.18	59.69	Instable
26	VTQTMKGLD	6.19	9.915.009	9	0.78	-0.311	-0.15	-18.36	Stable
27	GHKIMKNLENTVKE	8.84	16.398.716	14	1.00	-1.114	-0.30	12.01	Stable
28	TQTMKGLD	6.19	8.924.324	8	0.88	-0.875	-0.24	-11.29	Stable
29	MAASDISLL	3.80	9.194.684	9	0.33	1.389	0.15	22.60	Stable
30	ILNEPEDETHL	4.00	13.086.198	11	0.73	-0.991	-0.19	77.42	Instable
31	PMHIRL	10.11	7.654.319	6	0.83	0.150	-0.12	164.47	Instable
32	PEVDKEALEKFDKALKALPMHIRL	7.11	27.905.464	24	0.75	-0.417	-0.21	52.15	Instable
33	IIVTQTMKGLD	6.19	12.176.689	11	0.64	0.564	0.01	-20.92	Stable

34	ISLLDAQSAPLRV	6.19	13.817.928	13	0.69	0.692	-0.03	72.66	Instable
35	IQKVAGTW	9.11	9.015.021	8	0.75	0.138	0.01	-31.26	Stable
36	KYLKSLFPPASE	8.83	13.787.496	12	0.67	-0.433	-0.13	66.29	Instable
37	RTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIRL	8.76	30.476.953	26	0.88	-0.585	-0.27	48.91	Instable
38	DTDYKKYLLF	6.30	13.046.652	10	0.90	-0.770	-0.21	-6.03	Stable
39	EKFDKALKALPM(+15.99)HIRL	9.72	1.925.092	16	0.54	-0.237	-0.13	77.06	Instable
40	IIKYLKSLFPPASE	8.83	16.049.177	14	0.57	0.271	-0.01	52.19	Instable
41	RDYLPIVL	6.19	9.875.753	8	0.75	0.675	-0.02	22.21	Stable
42	KALPMHIRL	11.01	10.776.481	9	0.78	0.289	-0.11	134.38	Instable
43	IQIITF	5.88	7.334.374	6	0.50	2.017	0.32	28.90	Stable
44	FDDKIAKYIPIQ	5.96	14.497.867	12	0.00	-0.258	-0.11	2.90	Stable
45	INNQFLPYPYYAKPVA	8.43	18.969.773	16	1.00	-0.259	-0.02	2.90	Stable

46	FDDKIAKYIPIQ	5.96	14.497.867	12	0.00	-0.260	-0.11	2.91	Stable

Tabela 3. Sequencias e características dos peptídeos identificados em WPH T2

Nº:Number; PI: Theoretical isoeletric point; MW: Molecular weight; Aa: Residues of amino acids; NC: Net charge; GRAVY: Grand average of hydropathy; HF: Hidrofilicity; EI: Estability Index; C: Classification

Nº	**Sequence**	**PI**	**MW**	**Aa**	**NC**	**GRAVY**	**HF**	**EI**	**C**
1	VTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	18.749.924	17	0.76	-0.100	-0.08	-23.84	Stable
2	YSLAMAASDISL	3.80	12.406.010	12	0.42	1.017	0.11	19.45	Stable
3	YSLAMAASDISLL	3.80	13.536.849	13	0.42	1.231	0.11	18.72	Stable
4	KIDALNENKVLVL	6.42	14.678.661	13	0.77	0.331	-0.09	14.38	Stable
5	YSLAMAASDISLLDAQSAPLRV	4.21	22.911.831	22	0.59	0.623	-0.00	52.64	Instable
6	YVEELKPTPEGNL	4.26	14.877.507	13	0.69	-0.900	-0.16	28.82	Stable
7	IIVTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	21.011.606	19	0.68	0.384	0.01	-24.75	Stable
8	YVEELKPTPEGNLEIL	4.10	18.429.614	16	0.62	-0.431	-0.09	49.36	Instable
9	TMKGLDIQKVAGTW	8.94	15.468.177	14	0.71	-0.121	-0.07	-19.64	Stable
10	MAASDISLLDAQSAPLRV	4.21	18.569.666	18	0.61	0.567	-0.03	62.11	Instable
11	AFNPTQL	5.88	7.894.021	7	0.71	-0.129	-0.03	-6.31	Stable
12	ILNEPEDETHL	4.00	13.086.198	11	0.73	-0.991	-0.19	77.42	Instable

13	IVTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	19.880.764	18	0.72	0.156	-0.03	-26.68	Stable
14	DKALKALPMHIRL	10.01	15.048.911	13	0.77	0.062	-0.16	83.05	Instable
15	DIQKVAGTW	6.19	10.165.291	9	0.78	-0.267	-0.07	-26.68	Stable
16	EKFDKALKALPMHIRL	9.72	19.090.970	16	0.81	-0.237	-0.20	77.06	Instable
17	LDIQKVAGTW	6.19	11.296.132	10	0.70	0.140	-0.01	-23.01	Stable
18	YGGVSLPEW	4.00	10.064.760	9	0.44	-0.100	0.09	37.18	Stable
19	TQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	17.759.240	16	0.81	-0.369	-0.11	-20.65	Stable
20	VTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	18.909.873	17	0.52	-0.100	-0.05	-23.84)	Stable
21	FDKALKALPMHIRL	10.01	16.519.596	14	0.71	0.257	-0.10	86.64	Instable
22	IIVTQTMKGLD	6.19	12.176.689	11	0.64	0.564	0.01	-20.92	Stable
23	IIVTQTMKGLDIQKVAGTW	8.94	21.171.555	19	0.48	0.384	0.01	-24.75	Stable
24	KPTPEGNL	6.35	8.544.498	8	0.75	-1.425	-0.25	10.44	Stable
25	DTDYKKYLLF	6.30	13.046.652	10	0.90	-0.770	-0.21	-6.03	Stable
26	QTMKGLDIQKVAGTW	8.94	16.748.763	15	0.80	-0.347	-0.11	-17.67	Stable
27	NENKVLVL	6.35	9.275.389	8	0.88	0.200	-0.11	27.74	Stable
28	WWENPGVF	4.00	10.334.657	8	0.62	-0.475	0.09	5.15	Stable
29	EELKPTPEGNL	4.26	12.256.190	11	0.73	-1.327	-0.25	32.24	Stable
30	AMAASDISLL	3.80	9.905.056	10	0.30	1.430	0.16	21.34	Stable

31	YSLAMAASD	3.80	9.274.008	9	0.44	0.522	0.04	22.60	Stable
32	VRTPEVDKEALEKFDKA	4.95	19.740.421	17	0.94	-1.024	-0.35	8.06	Stable
33	VRTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIRL	8.76	31.467.637	27	0.85	-0.407	-0.24	47.47	Instable
34	ISLLDAQSAPLRV	6.19	13.817.928	13	0.69	0.692	-0.03	72.66	Instable
35	LEKFDKALKALPMHIRL	9.72	20.221.812	17	0.76	0.000	-0.16	73.12	Instable
36	LDAQSAPLRV	6.19	10.685.928	10	0.80	0.150	-0.14	91.46	Instable
37	IQKVAGTW	9.11	9.015.021	8	0.75	0.138	0.01	-31.26	Stable
38	KVAGTW	9.11	6.603.595	6	0.67	0.017	0.01	-45.02	Stable
39	MKGLDIQKVAGTW	8.94	14.457.700	13	0.69	-0.077	-0.06	-21.92	Stable
40	QKVAGTW	9.11	7.884.181	7	0.86	-0.486	-0.09	-37.16	Stable
41	KFDKALKALPMHIRL	10.30	17.800.544	15	0.80	-0.020	-0.17	81.53	Instable
42	VEELKPTPEGNLEIL	4.10	16.798.981	15	0.60	-0.373	-0.10	51.99	Instable
43	KALPMHIRL	11.01	10.776.481	9	0.78	0.289	-0.11	134.38	Instable
44	TQTMKGLD	6.19	8.924.324	8	0.88	-0.875	-0.24	-11.29	Stable
45	NENKVLVLDTDYKKYLL	6.46	20.671.252	17	0.94	-0.524	-0.21	9.51	Stable
46	YSLAMAASDISL	3.80	12.565.958	12	0.25	1.017	0.07	19.45	Stable
47	PTPEGNL	4.00	7.263.548	7	0.57	-1.071	-0.13	21.27	Stable

48	YVEELKPTPEGNLE	4.10	16.167.933	14	0.71	-1.086	-0.20	27.47	Stable
49	ALEKFDKALKALPMHIRL	9.72	20.932.183	18	0.72	0.100	-0.13	69.61	Instable
50	DTDYKKYLL	6.30	11.575.968	9	1.00	-1.167	-0.30	-7.81	Stable
51	DAQSAPLRVYVEELKPTPEGNLEIL	4.26	27.804.595	25	0.72	-0.368	-0.14	65.16	Instable
52	VTQTMKGLD	6.19	9.915.009	9	0.78	-0.311	-0.15	-18.36	Stable
53	PMHIRL	10.11	7.654.319	6	0.83	0.150	-0.12	164.47	Instable
54	RTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIRL	8.76	30.476.953	26	0.88	-0.585	-0.27	48.91	Instable

Tabela 4. Sequências e características dos peptídeos identificados em WPH T3

Nº:Number; PI: Theoretical isoeletric point; MW: Molecular weight; Aa: Residues of amino acids; NC: Net charge; GRAVY: Grand average of hydropathy; HF: Hidrofilicity; EI: Estability Index; C: Classification

Nº	**Sequence**	**PI**	**MW**	**Aa**	**NC**	**GRAVY**	**HF**	**EI**	**C**
1	YVEELKPTPEGNL	4.26	14.877.507	13	0.69	-0.900	-0.16	28.82	Stable
2	KIDALNENKVLVL	6.42	14.678.661	13	0.77	0.331	-0.09	14.38	Stable
3	EKFDKALKALPMHIRL	9.72	1.909.097	16	0.81	-0.237	-0.20	77.06	Instable
4	KFDKALKALPMHIRL	10.30	17.800.544	15	0.80	-0.020	-0.17	81.53	Instable
5	YGGVSLPEW	4.00	1.006.476	9	0.44	-0.100	0.09	37.18	Stable

6	VRTPEVDKEAL	4.68	12.556.771	11	0.91	-0.655	-0.29	3.51	Stable
7	AFNPTQL	5.88	7.894.021	7	0.71	-0.129	-0.03	-6.31	Stable
8	LKDYGGVSLPEW	4.38	13.626.819	12	0.58	-0.375	-0.04	23.31	Stable
9	LDIQKVAGTW	6.19	11.296.132	10	0.70	0.140	-0.01	-23.01	Stable
10	VRTPEVDKEALE	4.41	13.847.197	12	0.92	-0.892	-0.32	4.05	Stable
11	VRTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIRL	8.76	31.467.637	27	0.85	-0.407	-0.24	47.47	Instable
12	FDKALKALPMHIRL	10.01	16.519.596	14	0.71	0.257	-0.10	86.64	Instable
13	YVEELKPTPEGNLE	4.10	16.167.933	14	0.71	-1.086	-0.20	27.47	Stable
14	DKALKALPMHIRL	10.01	15.048.911	13	0.77	0.062	-0.16	83.05	Instable
15	LEKFDKALKALPMHIRL	9.72	20.221.812	17	0.76	0.000	-0.16	73.12	Instable
16	IQKVAGTW	9.11	9.015.021	8	0.75	0.138	0.01	-31.26	Stable
17	QKVAGTW	9.11	7.884.181	7	0.86	-0.486	-0.09	-37.16	Stable
18	ALEKFDKALKALPMHIRL	9.72	20.932.183	18	0.72	0.100	-0.13	69.61	Instable
19	KPTPEGNL	6.35	8.544.498	8	0.75	-1.425	-0.25	10.44	Stable
20	DIQKVAGTW	6.19	10.165.291	9	0.78	-0.267	-0.07	-26.68	Stable
21	ILNEPEDETHL	4.00	13.086.198	11	0.73	-0.991	-0.19	77.42	Instable
22	KALPMHIRL	11.01	10.776.481	9	0.78	0.289	-0.11	134.38	Instable
23	KVAGTW	9.11	6.603.595	6	0.67	0.017	0.01	-45.02	Stable
24	IIVTQTMKGLD	6.19	12.176.689	11	0.64	0.564	0.01	-20.92	Stable
25	TQTMKGLD	6.19	8.924.324	8	0.88	-0.875	-0.24	-11.29	Stable

26	NSAEPEQSL	3.80	9.734.352	9	0.89	-1.289	-0.26	119.82	Instable
27	LDAQSAPLRV	6.19	10.685.928	10	0.80	0.150	-0.14	91.46	Instable
28	DTDYKKYLL	6.30	11.575.968	9	1.00	-1.167	-0.30	-7.81	Stable
29	SPRQPQNQNPKLPLSIL	11.01	19.290.796	17	1.06	-1.059	-0.28	76.35	Instable
30	KALPMHIRLAFNPTQL	11.01	1.907.045	16	0.38	0.106	-0.04	73.45	Instable
31	KALKALPMHIRL	11.17	13.898.643	12	0.75	0.358	-0.11	96.21	Instable
32	VRTPEVDKEALEKFDKALKALPM	6.62	26.274.355	23	0.78	-0.504	-0.24	9.97	Stable
33	IIKYLKSLFPPASE	8.83	16.049.177	14	0.57	0.271	-0.01	52.19	Instable
34	AFNPTQLEGQCHV	5.25	14.426.613	13	0.69	-0.369	-0.09	20.49	Stable
35	EALEKFDKALKALPMHIRL	8.84	22.222.607	19	0.74	-0.089	-0.16	66.47	Instable
36	EKFDKALKALPMHIRL	9.72	1.925.092	16	0.54	-0.237	-0.13	77.06	Instable
37	KDYGGVSLPEW	4.38	12.495.979	11	0.64	-0.755	-0.09	32.24	Stable
38	VSLPEW	4.00	7.293.698	6	0.50	0.200	0.08	44.35	Instable
39	DKEALEKFDKALKALPMHIRL	8.76	24.653.828	21	0.81	-0.433	-0.23	57.05	Instable
40	SKEPSISREDL	4.68	12.596.357	11	1.09	-1.327	-0.40	79.13	Instable
41	VRTPEVDKEALEKFDKA	4.95	19.740.421	17	0.94	-1.024	-0.35	8.06	Stable
42	KTKIPAVF	10.02	9.025.589	8	0.62	0.400	-0.04	18.61	Stable
43	DKVGINY	6.18	8.074.127	7	0.86	-0.557	-0.14	-39.94	Stable
44	ALKALPMHIRL	11.01	12.617.693	11	0.64	0.745	-0.02	104.05	Instable

45	VRTPEVDKEALEKFDKALKA	6.62	22.862.583	20	0.90	-0.785	-0.31	4.11	Stable
46	PMHIRL	10.11	7.654.319	6	0.83	0.150	-0.12	164.47	Instable

4.2 ARTIGO 2

O seguinte artigo foi submetido a publicação no periódico *Food Hydrocolloids*, fator de impacto: 11,504, Qualis Capes para Ciências dos Alimentos: A1

Efeito da encapsulação do hidrolisado do soro do leite caprino como uma alternativa para aprisionamento de peptídeos bioativos: caracterização e avaliação da digestibilidade e bioacessibilidade

Maria Isabel Ferreira Campos [a]*, Ana Karolina de Sousa Lima [a], José Honório Pereira Lopes Neto [a], Kerolayne Santos Leite [b], Julia Mariano Caju de Oliveira [c], Fábio Florença Cardoso [d], Marcos Roberto de Mattos Fontes [d], Cristiani Viegas Brandão Grisi [e], Carlos Alberto de Almeida Gadelha [f], Tatiane Santi Gadelha [f] *

[a] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil

[b] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba - IFPB , PB, Brasil

[c] Programa de Pós-Graduação em Ciências da nutrição, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil

[d] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), SP, Brasil.

[e] Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), PB, Brasil

[f] Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil

*Autores correspondentes.

Endereço de e-mail: belcampos.va@gmail.com (Maria Isabel Ferreira Campos) santi.tatiane@gmail.com (Tatiane Santi Gadelha)

ABSTRACT

A ação enzimática ocasiona a formação de sequências proteicas fragmentadas das proteínas nativas as quais exercem diversas atividades biológicas. Entretanto, esses materiais são instáveis, hidrofóbicos, com sabor amargo e suscetíveis a degradação pelas condições gastrointestinais perdendo sua bioatividade. Portanto, o objetivo desse estudo foi encapsular um hidrolisado proteico do soro do leite caprino e avaliar as características estruturais, biológicas e o comportamento diante das condições gastrointestinais simuladas. O hidrolisado foi encapsulado por gelificação iônica usando como encapsulante alginato de sódio. Além disso foi avaliada a influência da liofilização e de um revestimento com soro do leite concentrado nas características das cápsulas. A liofilização das cápsulas provou ser uma estratégia útil para melhorar a solubilidade, taxa e eficiência de encapsulação, e, ao adicionar o revestimento de soro do leite caprino concentrado as cápsulas absorveram menos água do ambiente e mostraram menor atividade de água o que reflete em maior estabilidade. Estas cápsulas revestidas e secas demonstraram uma boa atividade antioxidante que foi preservada após as condições de digestão gastrointestinal exibindo maior quantidade de frações bioacessíveis ao fim da simulação in vitro. Dessa forma, a encapsulação se mostrou uma estratégia eficaz de proteção de estruturas proteicas hidrolisadas que pode ser útil na valorização da aplicação destes compostos e promover maiores oportunidades de utilizar hidrolisados proteicos do soro do leite caprino para o desenvolvimento de novas formulações de alimentos funcionais e de nutracêuticos.

Palavras-chave: peptídeos bioativos; soro do leite de cabra; microencapsulação; hidrolisados proteicos; bioacessibilidade; digestibilidade de hidrolisados;

1. INTRODUÇÃO

A indústria láctea é responsável pela geração de diversos tipos de resíduos e subprodutos, dentre eles o soro do leite, obtido pela coagulação da caseína que corresponde a

um volume de aproximadamente 80-95% do leite retendo até 55% dos nutrientes (Tsermoula et al., 2021). Devido aos seus efeitos benéficos a saúde, seu alto valor nutricional e a presença de componentes bioativos, produtos derivados de leite caprino tem se destacado no mercado, gerando a atenção de produtores, investidores e pesquisadores (dos Santos et al., 2023).

Em especial, as proteínas do soro do leite caprino são de alta qualidade biológica, com alto score de digestibilidade devido a pontuação de aminoácidos indispensáveis (DIAAS) e um substrato de interesse para processos como fermentação e a hidrólise enzimática, um processo controlado de fácil aplicação que produz fragmentos proteicos de baixo peso molecular, chamados de peptídeos bioativos (geralmente com 2 a 20 resíduos de aminoácidos) com alto potencial biológico e tecnológico (Ballatore et al., 2020; Herreman et al., 2020; Kheroufi, Brassesco, Campos, Boughellout, et al., 2022)

Dentre as proteínas do soro do leite caprino é marcante a presença de beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, albumina sérica, lactoperoxidase, lactoferrina, dentre outras (Campos et al., 2022). Estas proteínas, nos últimos anos, vêm sendo cada vez mais abordadas como componentes funcionais, sendo um dos efeitos mais reportados baseados em sua influência em desordens metabólicas devido ao seu potencial anti-hipertensivo, antidiabético, antioxidante, de regulação de apetite (Boscaini et al., 2023; Du, Jing, et al., 2022; Hussein et al., 2020). Além disso outros efeitos de interesse à indústria de alimentos também vêm sendo reportados, como o potencial antibacteriano, emulsificante, espumante que reforçam a relevância das proteínas do soro do leite em diferentes contextos (Medeiros et al., 2018; Minj & Anand, 2020).

Dada a versatilidade do soro do leite caprino, os hidrolisados tem potencial de serem explorados na indústria de nutracêuticos, como aditivos ou ingrediente alimentar, contudo poucos estudos tem sido reportados com esse enfoque até agora (Aguilar-Toalá et al., 2022; Singh et al., 2022). Essa dificuldade se relaciona principalmente a bioavaliabilidade destes após a ingestão, devido a sensibilidade dessas estruturas frente a digestão no trato gastrointestinal (Chakrabarti et al., 2018).

A encapsulação aparece como um processo promissor para contornar problemas da utilização de peptídeos bioativos (como sabor amargo, higroscopicidade e interações com a matriz alimentar) viabilizando assim maior estabilidade, integridade estrutural e consequentemente manutenção da bioatividade (Oliveira Lima et al., 2021; Sarabandi & Jafari, 2020).

Existem diversos métodos de encapsulação de bioativos e é imprescindível optar por uma técnica apropriada a aplicação desejada do material encapsulado conjunto à escolha de um material de parede que seja comestível, biodegradável, não tóxico e de baixo custo (Aguilar-Toalá et al., 2022). Dentre essas, a gelificação iônica é fundamentada na formação de ligações cruzadas por polieletrólitos na presença de íons, não necessita de equipamentos especializados, altas temperaturas ou solventes e pode ser usada em combinação com a liofilização é uma técnica adequada para compostos sensíveis ao calor (como peptídeos) por ser baseada apenas na mudança de fases da água (Nasri et al., 2021; Rezvankhah et al., 2020).

Em relação aos materiais de parede o alginato de sódio é um polissacarídeo amplamente utilizado nas técnicas de encapsulação por apresentar múltiplas vantagens como o baixo custo, alta viscosidade, biodegradabilidade e ser seguro para consumo (Aguilar-Toalá et al., 2022; Alvarado et al., 2019). Já o soro do leite pode ser aplicado tanto como material de parede ou como revestimento, uma vez que suas proteínas concentradas formam géis firmes e apresentam sítios de ligação com outros compostos o que desperta o interesse em utiliza-lo na

microencapsulação, sendo muito comum seu uso em processos de encapsulação por spray-drying (Krunić et al., 2019).

Nos últimos anos há um crescente interesse em encapsular hidrolisados do soro do leite. Giroldi et al. (2022) encapsularam hidrolisados proteicos bubalinos usando spray drying com goma arábica e maltodextrina como agentes encapsulantes. Corrêa et al. (2023) encapsulou hidrolisado de soro de ovelha testando o efeito do spray drying e da liofilização utilizando goma arábica como material de parede e Du, Huang. (et al., 2022) encapsulou hidrolisados do soro do leite de cabra a partir de um sistema de nanossomas, vesículas de bicamada compostas por surfactantes não iônicos e colesterol, semelhantes a lipossomas.

Contudo, a encapsulação de hidrolisados de soro de leite caprino utilizando alginato de sódio e o soro do leite concentrado como revestimento não foi reportada na literatura até agora logo o objetivo desse estudo foi avaliar a encapsulação de um hidrolisado proteico do soro do leite caprino, analisando a influência da adição de um revestimento proteico e da secagem por liofilização nas características morfológicas, estruturais, bioativas e investigar o comportamento das cápsulas frente ao processo de digestão gastrointestinal simulada avaliando também a bioacessibilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O leite caprino foi obtido do setor de caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba. A pepsina (800-1000 U/mg proteína) utilizada foi adquirida da Sigma e Aldrich (St. Louis, MO, USA). As membranas de diálise da Spectrum™ Labs Spectra/Por™ Dry Dialysis Kits e tinham 34 mm de diâmetro/20 cm de comprimento. O sistema de eletroforese utilizado foi da marca Loccus o marcador de peso molecular da GE Healthcare Life Sciences, (Nova Jersey, USA). Os reagentes 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid – TROLOX, ortho-phthalaldehyde (OPA), Pentilenetetrazol (PTZ), os padrões serina, e albumina sérica bovina da Sigma e Aldrich (St. Louis, MO, USA) O TPTZ foi adquirido da Dinâmica, São Paulo, Brasil. Os materiais usados para encapsulação foram alginato de sódio (Ultrapan, Valinhos, São Paulo, Brasil) e cloreto de cálcio di-hidratado - $CaCl_2$ (química moderna, Barueri, São Paulo, Brasil). Os outros reagentes e soluções utilizados foram todos de grau analítico.

2.2. Preparação do hidrolisado do soro do leite de cabra rico em peptídeos

O leite caprino foi desnatado em desnatadeira industrial com capacidade de 50 L, (modelo aberta 480 West, Brasil.). Em seguida, o leite foi submetido a precipitação ácida e processado até a obtenção de um concentrado proteico de acordo com o protocolo estabelecido em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (Campos et al., 2022). Foi utilizada a pepsina (concentração enzima substrato 1:50) para produzir fragmentos de baixo peso molecular a partir das proteínas do soro do leite caprino em um protocolo de hidrólise controlado. O soro do leite caprino foi reconstituído em uma solução de 6% (p/v) preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e deixado sob agitação leve por 1 h para completa solubilização. As condições da reação como tempo e pH (150 min e pH 2,2) foram estabelecidas com base em um estudo prévio do nosso grupo que obteve nessas condições um hidrolisado rico em frações de peptídeos de baixo peso molecular. Para as análises subsequentes foram utilizadas o soro do leite não hidrolisado – WPNH e o hidrolisado proteico - WPH (Ahmed et al., 2015; Tondo et al., 2020).

O grau de hidrólise foi determinado a partir da metodologia do OPA (o-ftaldialdeído) onde 100 µL de amostra (1 mg/mL) foi adicionado a 750 µL do reagente OPA, após 2 min em contato a absorbância foi medida no comprimento de onda de 340 nm (Silvestre et al., 2013; Spellman et al., 2003) o grau de hidrólise foi determinado pela seguinte equação:

$$GH\ (\%) = \Delta Abs \times 1{,}934\ d / c \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Onde ΔAbs é o valor da absorbância da amostra teste subtraído do valor da absorbância da amostra não hidrolisada. O valor fixo de 1,934 é o valor da massa molecular para as proteínas do soro do leite que é de 23644 Da, o componente d é o fator de diluição e c o valor obtido de proteína total pelo método de Kjeldahl.

2.3. Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada antes e depois da hidrólise por 2 métodos diferentes. Para avaliar o poder de redução total a amostra foi solubilizada na proporção de 1: 2,5: 2,5 com tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 6.6) e Ferricianeto de potássio (1% p/v). A mistura foi levada ao banho-maria a 50 ºC por 30 min e após resfriamento uma solução de ácido tricloroacético foi adicionada na mesma proporção (10% p/v) e centrifugada 2000 g por 10 min. Logo após, 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de água ultrapura e 200 µL de cloreto de ferro III (1% p/v) esse sistema foi deixado em repouso por 10 min em temperatura ambiente (25 ºC) e a absorbância foi medida a 700 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.) com água destilada como branco. . Os resultados foram expressos em densidade ótica com relação a absorbância mensurada (Krunić & Rakin, 2022; Oyaizu, 1986).

Para o método FRAP (Poder antioxidante de redução do ferro) procedeu-se o seguinte protocolo: Foram preparadas as soluções de 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina – TPTZ 10 mM diluída em uma solução de HCl 40 mM; Cloreto Férrico 20 mM; tampão acetato 0,3 M pH 3,6 e sulfato ferroso 2 mM. Para o preparo do reagente FRAP foram misturadas as soluções tampão, TPTZ e $FeCl_3$ na proporção de 10:1:1. Após foi adicionado 2,7 mL do reagente FRAP a uma alíquota de 120 µL das amostras e incubados a 37 ºC por 30 min protegidos da luz. A absorbância foi medida no comprimento de 593 nm e utilizou o reagente FRAP como branco. Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão determinada com sulfato ferroso FeSo4 (500 a 2000 mM) e expressos em µmol de FeSO4/mg de amostra (Rufino et al., 2006).

2.4. Caracterização estrutural e térmica

2.4.1. Espectroscopia de dicroísmo circular - CD

A estrutura secundária de WPNH e WPH foi investigada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em espectropolarímetro (J-815), equipado com termocontrolador (PTC-423S/15 Peltier JASCO, Tóquio, Japão). As amostras foram solubilizadas em água ultrapura, clarificadas por centrifugação a 10.000 × g por 10 min e quantificadas em um espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 280 nm. As medições dos espectros de CD das amostras com concentração final de ≈ 0,2 mg/mL foram feitas em uma faixa de 180-260 nm a 20 °C, a velocidade de varredura foi de 50 nm/min, a largura de banda de 2,0 nm, o tempo de resposta de 1,0 s, passo de dados de 0,5 nm e um fluxo constante de gás nitrogênio para evitar interferência de oxigênio.

Os espectros de CD finais correspondem a 20 medições, que foram acumuladas, calculadas em média e corrigidas a partir de água ultrapura (Costa et al., 2021; Grabner et al., 2017; Lakowicz, 1983). Como as amostras eram constituídas por mistura de proteínas (WPNH) ou peptídeos (WPH) com proporções e pesos moleculares indefinidos, os espectros de CD foram normalizados para elipticidade específica a partir do comprimento do caminho óptico (l) e concentração de massa. A estimativa de conteúdo das estruturas secundárias para cada amostra foi realizada no servidor online DichroWeb (Miles et al., 2022), usando o algoritmo CDSSTR (Johnson, 1999) e os graus experimentais de elipticidade (θ) e alcance espectral (λ) como os dados de entrada.

2.4.2. Análise do tamanho da partícula

A estrutura terciária/quaternária foi investigada por dispersão dinâmica de luz -DLS em um instrumento DynaPro Titan (Wyatt Technology, Santa Barbara, EUA). O preparo da amostra seguiu aquele descrito no tópico anterior. As medições DLS das amostras com uma concentração final de ≈ 3,5 mg/mL foram feitas a 20°C, usando uma cubeta de quartzo (l = 0,15 cm). Para cada amostra, foram coletadas 10 aquisições de 10 s cada após a estabilização da temperatura e potência do laser (Cardoso et al., 2020; Magro et al., 2020). Assim, a distribuição dos tamanhos das partículas SLC e SLCH foi expressa em raio hidrodinâmico e polidispersidade.

2.4.3. Caracterização das propriedades térmicas

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada nas amostras de soro do leite concentrado, hidrolisado livre e nas cápsulas utilizando um analisador termogravimétrico SHIMADZU modelo DTG-60 H. O ensaio não isotérmico foi feito utilizando 10 mg de amostra, em cadinho de alumínio com atmosfera de ar sintético e o protocolo seguido foi de: vazão de 50 mL/min, taxa de aquecimento de 10 °C/min, rampa de 25 a 800 °C. Os parâmetros térmicos das cápsulas foram avaliados por calorimetria exploratória diferencial (DSC-60) (SHIMADZU) operada com gás nitrogênio a 20 mL/min. Posteriormente, as amostras foram aquecidas até 550 °C a uma taxa de 10 °C/min. (Florentino et al., 2022).

2.5. Avaliação das propriedades tecnológicas

2.5.1. Capacidade de formação de espuma

A habilidade de formação de espuma (FE) das proteínas SLC e SLCH foi feita usando a metodologia de Caessens et al. (1997) com modificações. As amostras solubilizadas em água ultrapura (1%, p/v) foram colocadas em provetas de vidro graduadas e homogeneizadas a 4000 rpm por 1 min em Ultra-turrax. A morfologia das bolhas foi avaliada através de microscopia ótica, utilizando um microscópio REF e aumento de 5X. A FE foi calculada de acordo com a fórmula:

$$FA\ (\%) = [(V1-V0)/V0] \times 100 \qquad \text{(Eq. 2)}$$

Onde V0: Volume inicial; V1: Volume após homogeneização

2.5.2. Índice de atividade emulsificante

Para determinar o índice de atividade emulsificante uma alíquota de 3 mL das amostras (0,2% p/v) foram homogeneizadas com 1 mL de óleo de milho (ϕ, fração de volume da fase dispersa = 0,25) em um Ultra-turrax por 3 min a 20.000 rpm. Após a homogeneização 20 µL da emulsão foi adicionado a 10 mL de SDS a 0,1 % (diluição da proteína 1/500) e a absorbância foi imediatamente mensurada a 500 nm (Chicón et al., 2009). A conversão do valor da absorbância para a unidade EAI (m^2/g^{-1}) foi feita de acordo com a seguinte fórmula (Pearce & Kinsella, 1978).

$$EAI\ (m^2/g^{-1}) = 2T/\Phi C \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Onde, T: Turbidez = 2,3; A: absorbância a 500 nm; I: é o comprimento do caminho da luz (m); Φ: fração de volume da fase dispersa; C: concentração de proteínas antes da formação da emulsão.

2.6. Microencapsulação do hidrolisado proteico

2.6.1. Fabricação das cápsulas contendo o hidrolisado

A encapsulação do hidrolisado proteico do soro caprino foi realizada pelo método de gelificação iônica por extrusão de acordo com a metodologia descrita por Lopes Neto et al.

(2021) e Ma et al. (2014). Inicialmente a amostra foi solubilizada em água destilada (10 mg.mL) e adicionada a solução de alginato de sódio, este sistema foi mantido sob agitação lenta por 30 min para garantir a mistura dos componentes. A seguir a solução biopolimérica contendo o hidrolisado foi gotejada utilizando uma seringa de 1 mL em uma distância de aproximadamente 30 cm sob uma solução de cloreto de cálcio (4% p/v) sob agitação continua e branda.

Após a formação das cápsulas estas foram mantidas em repouso na solução de cálcio por 30 minutos para completar a gelificação, em seguida filtradas (utilizando papel filtro qualitativo tipo Whatman® 3MM n.4) e lavadas com água destilada. A quantidade de amostra a ser encapsulada foi estabelecida com base nos resultados de taxa de encapsulação, sendo testadas concentrações de 10, 25 e 50 mg.mL (Alvarado et al., 2019; Ma et al., 2014; Sarabandi et al., 2020).

Uma vez estabelecida a concentração ideal de núcleo foi avaliada a influência do revestimento de uma solução de soro concentrado a 5% e da secagem por liofilização. Todos as cápsulas foram fabricadas com alginato como material de parede e assim foram estabelecidos 4 tratamentos sendo estes: Cápsula sem revestimento e sem secagem (controle-T0); Cápsula com adição do revestimento proteico e não seca (T1); cápsula sem revestimento proteico, liofilizada (T2); e cápsula com revestimento liofilizada (T3). Os tratamentos T1 e T3 foram submergidos em uma solução de soro concentrado a 5% durante 60 min, cuidadosamente transferidas para placas de petri, congeladas (-20 ºC) e liofilizadas (T2 e T3) ou mantidos sob refrigeração (T0 e T1) para condução dos experimentos seguintes.

2.6.2. Taxa e eficiência de encapsulação – EE

Para o cálculo da taxa de encapsulação foram avaliados o conteúdo de proteína adicionado à solução biopolimérica e o conteúdo de proteína que ficou disperso na solução de cloreto de cálcio pelo método de Bradford (1976). Para mensurar a eficiência de encapsulação - EE as cápsulas foram solubilizadas (10 mg/mL de água destilada) e centrifugadas por 10 min a 2500 × g, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e o conteúdo de proteína determinado. Assim a EE (%) foi calculada com base na quantidade de proteína no sobrenadante em relação a quantidade de proteína inicial adicionada (Sarabandi et al., 2019) Para as cápsulas com revestimento proteico (T1 e T3) foi descontado o valor de proteína correspondente a solução.

2.6.3. Solubilidade

Para avaliação da solubilidade das cápsulas a amostras foram diluídas em água destilada em uma concentração de 1% (p/v), o pH foi ajustado (T: 25 ºC) com 1 M HCl ou 1 M NaOH para 3, 5 e 7 e a amostra foi centrifugada a 20000 g por 15 min a 23 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída (1:10) em tampão de dissociação (0,5M EDTA, 8 M Urea pH 10) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 280 nm. A solubilidade foi calculada a partir da razão entre a absorbância do sobrenadante e da suspensão antes da centrifugação (Giroldi et al., 2022; Jambrak et al., 2014). Os tratamentos com melhor eficiência de encapsulação e solubilidade foi escolhido para ser utilizado nas análises subsequentes.

2.7. Avaliação das propriedades das cápsulas

2.7.1. Características morfológicas e análise das propriedades físicas

As cápsulas imediatamente após o processo de preparação foram analisadas usando um microscópio óptico (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Reino Unido) com ampliação de 5 vezes. Para melhor visualização da superfície foram coradas com uma alíquota do reagente de Bradford (Krunić & Rakin, 2022).

A morfologia das micropartículas, do soro do leite hidrolisado e não hidrolisado foi realizada utilizado microscópio eletrônico de varredura com detector eletrosecundário, Modelo LEO 1430 (Zeiss, Goettingen, Alemanha). As amostras foram dispostas em papel adesivo de

carbono e recobertas com uma fina camada de ouro 200 Å (ångström) a análise procedeu a uma tensão de aceleração de 10 kV, distância de trabalho de 10 mm e a magnitude de ampliação variou entre 50 a 100 x (Giroldi et al., 2022; Lopes Neto et al., 2021).

A higroscopicidade das cápsulas foi avaliada de acordo com o método baseado na descrição de Cai & Corke. (2000) com as modificações realizadas por De Souza et al. (2019). As amostras foram dispostas em recipientes de plástico e inseridas em um sistema de atmosfera controlada, contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa 75,29%), mantidas em estufa a 25 ºC por 7 dias. A higroscopicidade foi expressa em % de ganho de peso. A atividade de água (AOAC, 2016) das amostras foi monitorada antes de iniciar a análise de higroscopicidade e ao final dos 7 dias.

As estruturas cristalinas das microcápsulas foram investigadas por difratôgrama de raios X equipado com tubo de cobre, usando radiação Cu-Kα (1,5418 Å) com uma tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. As amostras foram analisadas em uma faixa angular de difração de $2\theta = 10°–50°$ e velocidade de $2° \text{ min}^{-1}$ (Florentino et al., 2022).

As amostras (5 mg/mL) foram avaliadas por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige 21 SHIMADZU, Japão), utilizando o método de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de transmitância, na faixa de 4000 a 600 cm-1, com resolução de 4 cm-1 e 20 varreduras.

2.8. Avaliação da digestibilidade gastrointestinal e da bioacessibilidade

A capacidade de liberação das cápsulas foi avaliada a partir da metodologia descrita por Minekus et al. (2014) utilizando os protocolos simulados das fases digestivas oral, gástrica e intestinal para avaliar o comportamento de WPH, T2 e T3.O fluido salivar (pH 7,0) foi obtido preparando uma solução de Na_2HPO_4, KH_2PO_4 e NaCl e α-Amilase (EC 3.2.1.1) (200 U de atividade enzimática). O líquido gástrico (pH 3,0) foi obtido pela mistura de 0,31% de pepsina (EC 3.4.23.1) e NaCl 0,03 M e HCl 1 M. O fluido intestinal (pH 6,0) continha pancreatina e extrato de bile suína em $NaHCO_3$ 0,1 M.

Na fase oral o fluido salivar foi colocado em contato com 50 mg das cápsulas e do hidrolisado livre, incubados a pH 7 por 2 min. Em seguida, o fluido gástrico (pH 3,0) foi adicionado e o sistema foi mantido sob incubação e agitação por 120 min. Após o fim do tempo, o fluido intestinal (pH 7,0) foi acrescentado e as amostras foram mantidas incubadas sob agitação por 120 min. Todo o protocolo foi realizado em incubadora tipo shaker sob condições fixas de 37 ºC e 150 rpm.

Alíquotas foram retiradas ao final de cada fase, e a reação foi interrompida por centrifugação (3000 x g por 20 min). O conteúdo de proteína foi determinado sendo o precipitado tido como a parte insolúvel (potencialmente não absorvível), enquanto o sobrenadante relativo as proteínas solúveis (provavelmente absorvíveis) (Ayala-Rodríguez et al., 2022). A atividade antioxidante, pelo método DPPH, foi avaliada para mensurar a proteção da bioatividade ocasionada pela encapsulação.

O processo de absorção intestinal foi simulado a partir de um modelo de barreira epitelial onde a amostra digerida foi inserida em sacos de diálise (MW *cut-off* de 3 kDa) e imersos na solução de fluido intestinal a 37 ºC por 120 min com agitação manual e gentil a cada 15 min para simulação dos movimentos peristálticos. Após a simulação amostra foi centrifugada a 3000 x g por 20 min e o conteúdo de proteína do sobrenadante foi determinado obendo-se o valor da bioacessibilidade com base na equação:

$$BP\ (\%) = (PT\ d / PT\ I) \qquad \text{(Eq.)}$$

Onde, BP: bioacessibilidade proteica; PT: teor de proteína da amostra digerida dialisada em mg/mL; PT I: conteúdo de proteína inicial da amostra não digerida

2.9. Análises estatísticas

Todos as análises foram realizadas em triplicata e avaliadas quanto ao teste de análise de variância ANOVA entre as médias. Para comparação entre os tratamentos foi realizado o teste de Tukey, assumindo que diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente diferentes e os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism 7.0 ou Origin Pro 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção do hidrolisado proteico do soro do leite caprino e avaliação da atividade antioxidante

Um hidrolisado proteico com GH de 37,2 % ±0,5 foi obtido contendo fragmentos de baixo peso molecular oriundos das proteínas do soro do leite de cabra, que apresentou maior potencial antioxidante ($P < 0.05$) quando comparado a proteína não hidrolisada para todos os métodos avaliados (Tabela 1) evidenciando que a hidrólise melhora a bioatividade das proteínas do soro do leite caprino.

Tabela 1. Atividade antioxidante do WPH e WPNH pelos métodos de PRT (densidade ótica), FRAP (µmol Trolox/mg Ptn), ABTS e DPPH (µmol Trolox/mg Ptn).

Amostra	*Screening* de atividade antioxidante			
	PRT	FRAP	ABTS	DPPH
WPH	$0,483 \pm 0,003^{a}$	$475,04 \pm 0,006^{a}$	$2,71 \pm 0,001^{a}$	$3,26 \pm 0,005^{a}$
WPNH	$0,209 \pm 0,001^{b}$	$225,33 \pm 0,002^{b}$	$0,43 \pm 0,006^{b}$	$2,57 \pm 0,003^{b}$

WPH – Soro do leite hidrolisado; WPNH – Soro do leite concentrado não hidrolisado. Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna representam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Todos os resultados foram realizados em triplicata e avaliados quanto a diferença utilizando o Teste de Tukey com 5% de significância.

Pelos diferentes métodos testados foi observado que as proteínas e peptídeos apresentaram diferentes valores de atividade antioxidante. Essa tendência, de variabilidade nos resultados, a depender do método foi reportada por alguns autores como relacionada a interação do composto analisado com os radicais ABTS e DPPH, principalmente. Proteínas e peptídeos tendem a ter menor interação com o radical ABTS o que corrobora com os menores valores encontrados neste estudo para este método. Todavia, há uma maior afinidade destes (3,26 µmol Trolox/mg Ptn) frente ao radical DPPH, um composto com maior solubilidade em solventes apolares o que pode ser devido a interações hidrofóbicas com peptídeos e aminoácidos com essa característica (Kheroufi, Brassesco, Campos, Mouzai, et al., 2022; Krunić & Rakin, 2022).

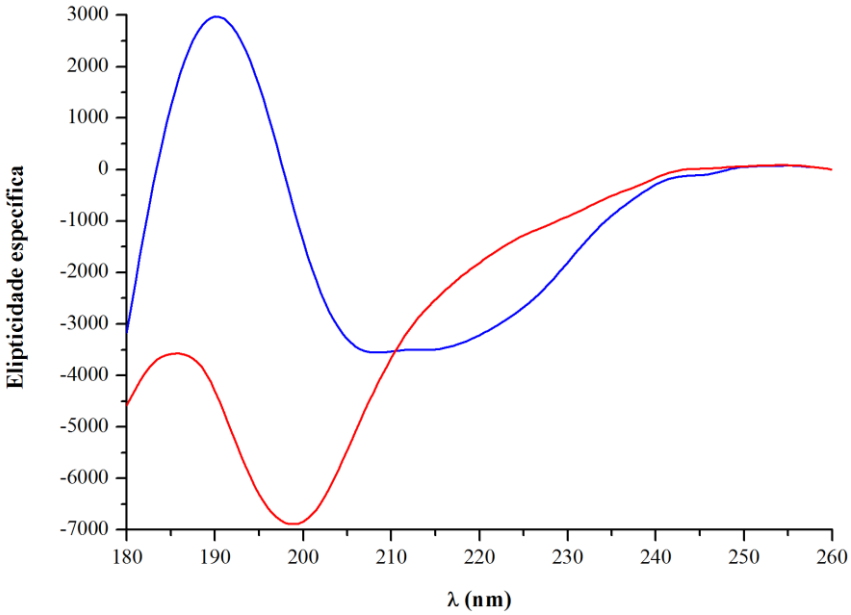
Estes resultados diferem dos encontrados por Bustamante et al. (2021) e Krunić & Rakin (2022), que testaram diferentes enzimas (tripsina, alcalase, quimiotripsina e flavourzyme) para a obtenção de hidrolisados do soro do leite e essa distinção pode estar relacionada ao sítio ativo da enzima, uma vez que a pepsina cliva ligações peptídicas entre Phe, Tyr, Trp e Leu sendo assim, os peptídeos gerados a partir da ação dessa enzima são formados por esses aminoácidos em suas cadeias laterais (Embiriekah et al., 2018).

Os aminoácidos Trp, Phe, Tyr, são doadores de prótons exercendo ação antioxidante ao impedir a cascata de reações de oxidação por quebrar a cadeia de radicais livres ao doar de átomo de hidrogênio (Hossain et al., 2012). Este fato está correlacionado com os resultados deste estudo, tendo em vista que o hidrolisado atingiu valores de 0,483 OD e 475,04 (µmol sulfato ferroso/mg) para as análises de PRT e FRAP.

3.2. Alterações na estrutura secundária por espectroscopia de dicroísmo circular

As modificações na estrutura secundária da proteína do soro do leite de cabra causadas pela atividade proteolítica da pepsina foram avaliadas por dicroísmo circular. O espectro normalizado com água ultrapura foi comparado com o espectro das proteínas nativas (Fig. 1).

Figura 1. Elipticidade específica de WPNH (azul) e WPH (vermelho)



Modificações surgiram na estrutura secundária resultantes da quebra das cadeias peptídicas pela pepsina. O soro do leite sem hidrólise possui organização secundária em água ultrapura, ao passo que a hidrólise de WP resultou em cadeias peptídicas sem a formação de α-hélices- e folhas-β.

O espectro de CD de WPNH (Fig.1) mostrou um pico fortemente positivo no comprimento de onda de 190-195 nm e um pico negativo em torno de 208 a 210 nm correlacionado a estrutura de α-hélice. O pico em WPH indica uma mudança intensa na elipticidade e a formação de um pico fortemente negativo indicando a perda da estrutura. Os resultados deste estudo foram semelhantes aos encontrados a outros estudos utilizando hidrolisados proteicos (Zheng et al., 2019).

A análise de convolução da Tabela 2 indica que para WPH o menor % de α-hélices- e folhas-β está relacionado a desnaturação parcial das proteínas caracterizado pela perda estrutural. Uma vez que não houve aplicação de tratamentos que viessem a induzir tal alteração, o pH ácido ao qual a amostra foi submetida para a ação da pepsina em conjunto com a atividade proteolítica pode ter levado a um rearranjo das estruturas de α-hélices para uma forma de espiral aleatória, similar ao observado por Zheng et al. (2019). Nesse estado as hélices são enroladas umas sobre as outras para formar feixes super helicoidais consistindo em duas ou três hélices orientadas paralela ou antiparalelamente, que são oligômeros da mesma ou de cadeias diferentes, ou ainda hélices consecutivas da mesma cadeia polipeptídica (Lupas et al., 2017).

Tabela 2. Caracterização da estrutura secundária do soro do leite de cabra hidrolisado

Estrutura	α-Hélice regular	α-Hélice distorcida	Folha-β regular	Folha-β distorcida	"Turns"	Não-ordenada
Fração (%)	1	4	27	14	11	42

As alterações estruturais das proteínas do soro do leite caprino ocasionadas pela hidrólise pode representar uma alternativa para pessoas sensíveis as proteínas do leite, uma vez que esse processo melhora a digestibilidade destas tornando-as mais facilmente absorvida pelo organismo (Feng et al., 2022).

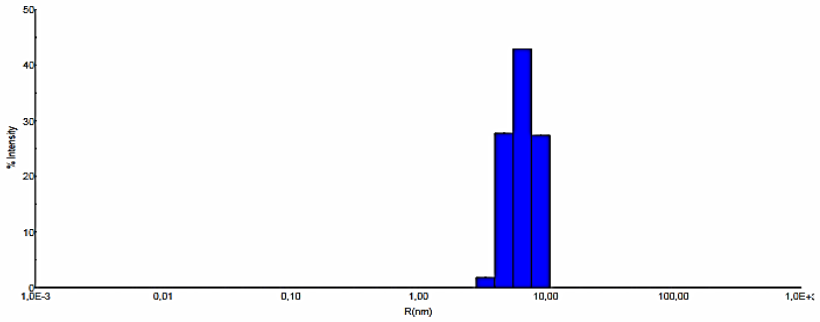
3.3. Avaliação do tamanho das partículas por DLS

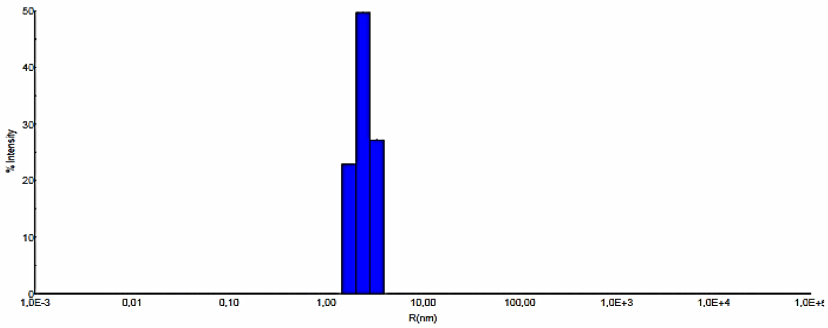
O tamanho da partícula das amostras foi analisado usando dispersão de luz dinâmica (Tabela 3) e a intensidade do tamanho das partículas está esquematizada na Figura 2 (A e B). A amostra não hidrolisada (Fig 1B) apresentou maior tamanho de partículas (mais próximos aos 10 nm) e com 4 picos nas distribuições de tamanho de partícula (PSDs), enquanto o hidrolisado (Fig. 2B) exibiu três picos correspondentes a um tamanho de partícula mais próximos a 1 nm. Como a matriz estudada tratava-se de um *pool* proteico não foi possível determinar o tamanho individual das proteínas presentes. Comportamento similar aquele encontrado por Li et al. (2022) que notaram um tamanho em torno de 2–5 nm para proteínas purificadas do soro do leite exibindo um pico maior de 2,3 nm referente a β-lactoglobulina.

Tabela 3 Raio hidrodinâmico (RH) e polidispersidade (PD)

Amostra	**Raio hidrodinâmico (nm)**	**Polidispersidade (%)**	**Massa (%)**
WPNH	6,7	25,8	95,3
WPH	2,5	23,4	97,4

Figura 2. Distribuição do tamanho das partículas nas amostras de proteína do soro do leite caprino nativa (A) e hidrolisada (B)





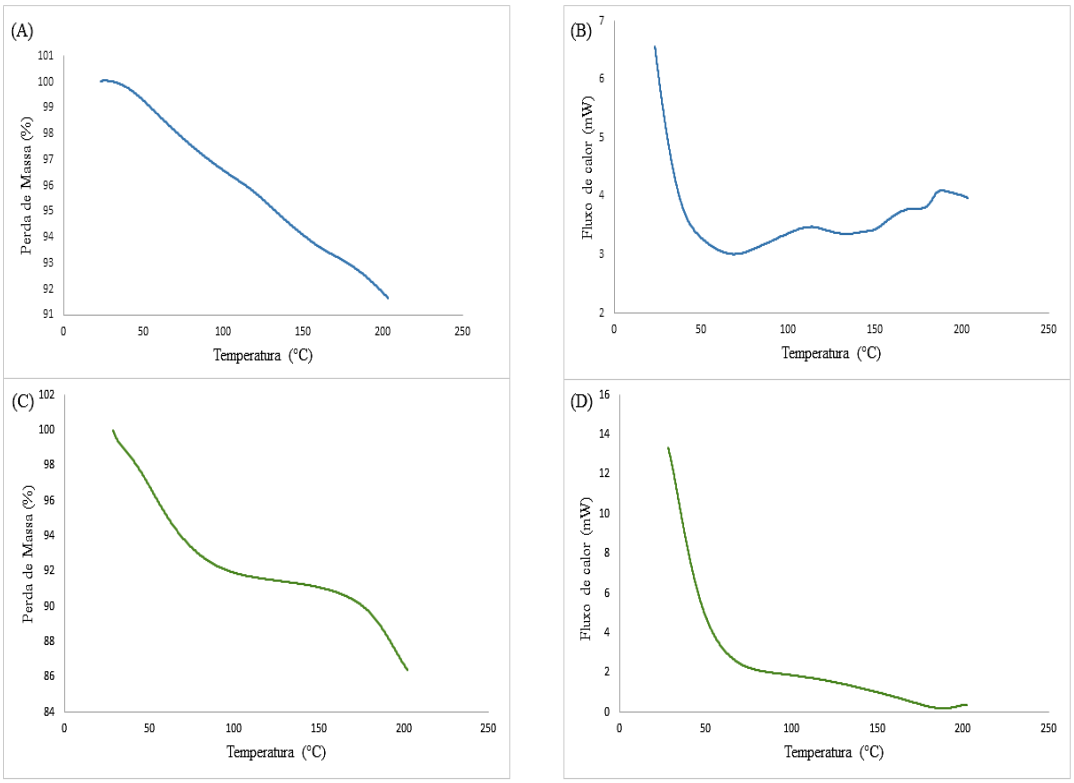
Nota-se que houve uma diminuição no tamanho da partícula do hidrolisado em relação a proteína nativa, consistindo com o elevado grau de hidrólise, a obtenção de peptídeos, aminoácidos livres corroborando com resultados encontrados por Wang et al. (2021) na avaliação do tamanho de partículas de hidrolisados proteicos

O menor valor do raio hidrodinâmico também pode estar relacionado a mudança na conformação da proteína para uma estrutura monomérica (apenas uma cadeia peptídica) refletindo na diminuição da polidispersidade, e consequente maior uniformidade do hidrolisado (Tabela 3). Tal comportamento indica que a hidrólise com pepsina melhorou a uniformidade das proteínas do soro do leite de cabra. (Costa et al., 2021; Du, Jing, et al., 2022)

3.4. Propriedades térmicas

A preservação da estrutura de uma proteína ou peptídeo está diretamente relacionada as propriedades biológicas, tecnológicas e de digestibilidade. Assim é importante avaliar o comportamento térmico de uma proteína tendo em vista que os aspectos funcionais podem ser comprometidos além de possibilitar a escolha de condições de processamento mais adequadas a conservação (Accardo et al., 2022). A estabilidade térmica das proteínas foi avaliada através da análise de TG e DSC (Fig 3.)

Figura 3. Curvas de comportamento térmico DSC (A e C) e TG (B e D) de WPNH (azul) e WPH (verde)



De acordo com os termogramas é possível observar que a perda de massa do WPNH foi menor (91,61%) quando comparada as proteínas hidrolisadas (86,28%) indicando que estas são mais estáveis a aplicações de calor. A estrutura globular das proteínas do soro do leite (β-Lg, α-La e imunoglobulinas) por apresentarem uma disposição espacial mais complexa conferem maior resistência térmica evidenciado na Figura 3 (A e C) (Qi & Onwulata, 2011).

Os resultados de CD e DLS confirmaram que na amostra hidrolisada aconteceram alterações estruturais que ocasionaram a perda da estrutura terciária e secundária nos hidrolisados o que altera as interações intermoleculares como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas resultando na menor estabilidade térmica e corroborando com o encontrado por Tarhan et al. (2016) o qual observou que a desnaturação causada pela atividade enzimática influenciou negativamente na estabilidade térmica das amostras de um isolado proteico do soro do leite.

Quanto ao comportamento frente as curvas de entalpia (Fig. 3 B e D) a amostra não hidrolisada apresentou fenômenos distintos: um pico com concavidade voltada para baixo (caráter exotérmico) em torno de 70 ºC, que segundo Tarhan et al. (2016) é correspondente a desnaturação da β-Lg e três picos voltados para cima (caráter endotérmico). Ao passo que WPH retornou apenas picos exotérmicos, um comportamento semelhantes ao encontrado por Abadía-García et al. (2016).

A ausência de picos endotérmicos em WPH pode estar correlacionada com a obtenção de peptídeos termicamente sensíveis que acabam sofrendo degradação com a aplicação de calor. Tendo que a bioatividade está relacionada com a manutenção estrutural são necessárias estratégias, como a encapsulação, que possam resguardar esses componentes.

3.5. Propriedades tecnológicas

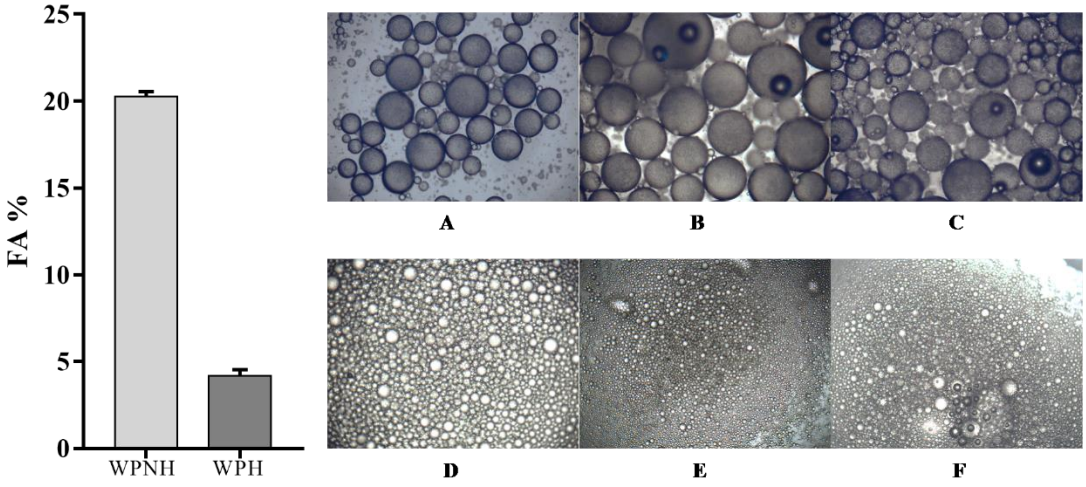
3.5.1. Atividade espumante

A habilidade de uma proteína em exercer uma maior atividade espumante está relacionada a migração, desdobramento e reorganização mais rápida para a interface ar-água reduzindo a tensão superficial (Ryan et al., 2023). A atividade espumante (Fig. 4) aumentou como resultado da hidrólise das proteínas do soro do leite caprino (20,27 %) em comparação as proteínas nativas (4,2 %).

Mudanças nas características das bolhas também foram observadas, para WPH as bolhas obtidas da formação da espuma foram maiores e mais uniformemente distribuídas na superfície enquanto que para WPNH estas se mostraram mais espalhadas e com diâmetro visualmente menor. Devido ao grau de hidrólise de 37% entende-se que houve a liberação de aminoácidos e fragmentos proteicos, estes por sua vez influenciaram no aumento da carga líquida e afetaram a adsorção interfacial das proteínas contribuindo com o aumento da formação de espuma (Karami & Akbari-adergani, 2019; Kheroufi, Brassesco, Campos, Mouzai, et al., 2022).

O comportamento da formação de espuma do hidrolisado obtido corrobora com os resultados encontrados na literatura para proteínas do soro do leite, que demonstram que o grau de hidrolise assim como a enzima utilizada podem influenciar positivamente nas características tecnológicas das proteínas sendo uma alternativa para aplicação em processos onde a formação de espuma é desejável (John & Ghosh, 2021; Kheroufi, Brassesco, Campos, Boughellout, et al., 2022; Kheroufi, Brassesco, Campos, Mouzai, et al., 2022; Ryan et al., 2023)

Figura 4. Capacidade de formação de espuma e avaliação morfológica das bolhas



A-C: microscopia ótica da morfologia das bolhas formadas pela formação de espuma do WPH. D-F: microscopia ótica da morfologia das bolhas formadas pela formação de espuma do WPNH.

3.6. Avaliação do índice de atividade emulsificante (IAE)

Proteínas do soro do leite são importantes emulsificantes naturais frequentemente aplicadas em diversos tipos de produtos. Com a hidrólise do soro do leite caprino houve aumento do IAE de 227,48 mg/m² para WPNH alcançando 391 mg/m² em WPH demonstrando que as frações de baixo peso molecular obtidas em WPNH possuem um bom potencial emulsificante, semelhante aos avaliados em outros trabalhos, (Kheroufi, Brassesco, Campos, Boughellout, et al., 2022; Kheroufi, Brassesco, Campos, Mouzai, et al., 2022).

Esse aumento pode estar relacionado a mudanças na conformação da proteína devido a hidrólise que alteraram a carga neutra residual, aumentando a tensão superficial. Essa alteração interfacial é relativa a uma maior exposição de grupamentos anfifílicos que aumentam a superfície de hidrofobicidade das proteínas possibilitando maior interação entre óleo/àgua (Karami & Akbari-adergani, 2019; Minj & Anand, 2020).

Portanto, hidrolisar proteínas do soro do leite caprino configura uma alternativa eficaz para melhorar propriedades emulsificantes, podendo assim ser útil em aplicações tecnológicas na indústria de alimentos ou farmacêutica a exemplo o uso destas em nanoemulsões, as quais que apresentam propriedades físico-químicas distintas das emulsões convencionais (menores tamanhos de gotículas, maior área de superfície dentre outras) (Adjonu et al., 2022).

3.7. Preparação das cápsulas contendo o soro do leite caprino hidrolisado

As cápsulas contendo o hidrolisado proteico do soro do leite foram preparadas utilizando alginato de sódio como material de parede, uma vez que polissacarídeos tem sido descritos como bons agentes encapsulantes para hidrolisados bioativos (Wei et al., 2020). A concentração de hidrolisado que apresentou melhor taxa de encapsulação (TE) foi 10 mg/mL retornando EE de 95,8 %.

Com o aumento da concentração de proteína na solução biopolimérica a TE diminuiu (25 mg/mL: 37,2 % e 50 mg/mL: 17,87 %) ou seja ocorreu dispersão da proteína e esta não foi englobada no núcleo da cápsula. Isto pode ter sido provocado pela menor solubilidade das proteínas na solução de alginato resultando em menor quantidade de hidrolisado encapsulado. Portanto, para fabricação das cápsulas e etapas subsequentes utilizamos a concentração de 10 mg/mL de WPH.

A eficiência de encapsulação (EE) e a solubilidade (Tabela 4) são parâmetros importantes para avaliar a efetividade da encapsulação e o potencial da sua aplicabilidade. A liofilização e o recobrimento melhoraram a EE e a solubilidade (com exceção do pH 5), corroborando com o estudo de Alvarado et al. (2019) com hidrolisados proteicos encapsulados com alginato de sódio. A interação entre o polissacarídeo e a proteína pode ter levado a formação de um filme protetor nas cápsulas, melhorando o poder de aprisionamento resultando em melhores características após o processo de secagem.

Tabela 4. Teste de eficiência de encapsulação e avaliação da solubilidade do WPH encapsulado

Tratamento	EE %	Solubilidade %		
		pH 3	pH 5	pH 7
T0	$89,21 \pm 0,02^{C}$	$62,44 \pm 0,20^{bD}$	$54,56 \pm 0,37^{cD}$	$71,2 \pm 0,08^{aD}$
T1	$92,02 \pm 0,05^{B}$	$81,57 \pm 0,06^{aC}$	$78,38 \pm 0,33^{bC}$	$82,28 \pm 0,27^{aC}$
T2	$96,54 \pm 1,12^{A}$	$86,23 \pm 0,12^{bB}$	$75,54 \pm 0,04^{cB}$	$98,52 \pm 0,23^{aB}$
T3	$98,28 \pm 2,71^{A}$	$105,7 \pm 0,14^{bA}$	$94,69 \pm 0,25^{cA}$	$119,5 \pm 0,20^{aA}$

T0 - Cápsula sem revestimento e sem secagem; T1-Cápsula com adição do revestimento proteico e não seca; T2-cápsula sem revestimento proteico, liofilizada; T3 - cápsula com revestimento liofilizada. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha, para o mesmo tratamento, representam uma diferença significativa ($P < 0,05$). Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna representam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Todos os resultados foram realizados em triplicata e avaliados quanto a diferença utilizando o Teste de Tukey com 5% de significância.

É importante analisar diversos valores de pH pois possibilita ponderar a aplicação das cápsulas em diferentes matrizes alimentares (Giroldi et al., 2022). Na tabela 4 foi observado

que houve influência das variações de pH na solubilidade das cápsulas (Tabela 4) para todas as faixas de pH e em todos os tratamentos sendo o pH 7 a melhor condição para a solubilidade ($P < 0,05$). Quando as cápsulas foram submetidas as condições de pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, a solubilidade diminuiu ($P < 0,05$) pois a soma das cargas em condições de pH próximo ao ponto isoelétrico ocasiona alterações intermoleculares que diminuem a interação proteína-água e aumentam a interação proteína-proteína.

O revestimento proteico melhorou os valores de solubilidade, sugerindo que a combinação entre soro do leite caprino concentrado e alginato de sódio é promissora para encapsulação de hidrolisados proteicos, evidenciando a versatilidade do soro do leite para processos tecnológicos (de Araújo Etchepare et al., 2020; Sarabandi et al., 2018). Assim com base no comportamento evidenciado as cápsulas liofilizadas foram utilizadas para dar seguimento ao estudo, e assim podemos avaliar a influência do revestimento proteico nos encapsulados de WPH.

3.8. Avaliação das propriedades das cápsulas de WPH

A análise morfológica de WPNH, WPH e das cápsulas pode ser visualizada na Figura 5 (A-D) por MEV e MO (apenas das cápsulas, Fig. 5 E-F) onde foi possível observar as características das partículas tais como tamanho, forma e aparência da superfície. WPNH e WPNH apresentaram algumas diferenças estruturais, para WPNH: as estruturas integras das proteínas foram visualizadas com rugosidades características de estruturas globulares das proteínas do soro do leite. Como resultado da hidrólise essas partículas aparecem fragmentadas e com tamanhos menores (Fig. 5 A-B)

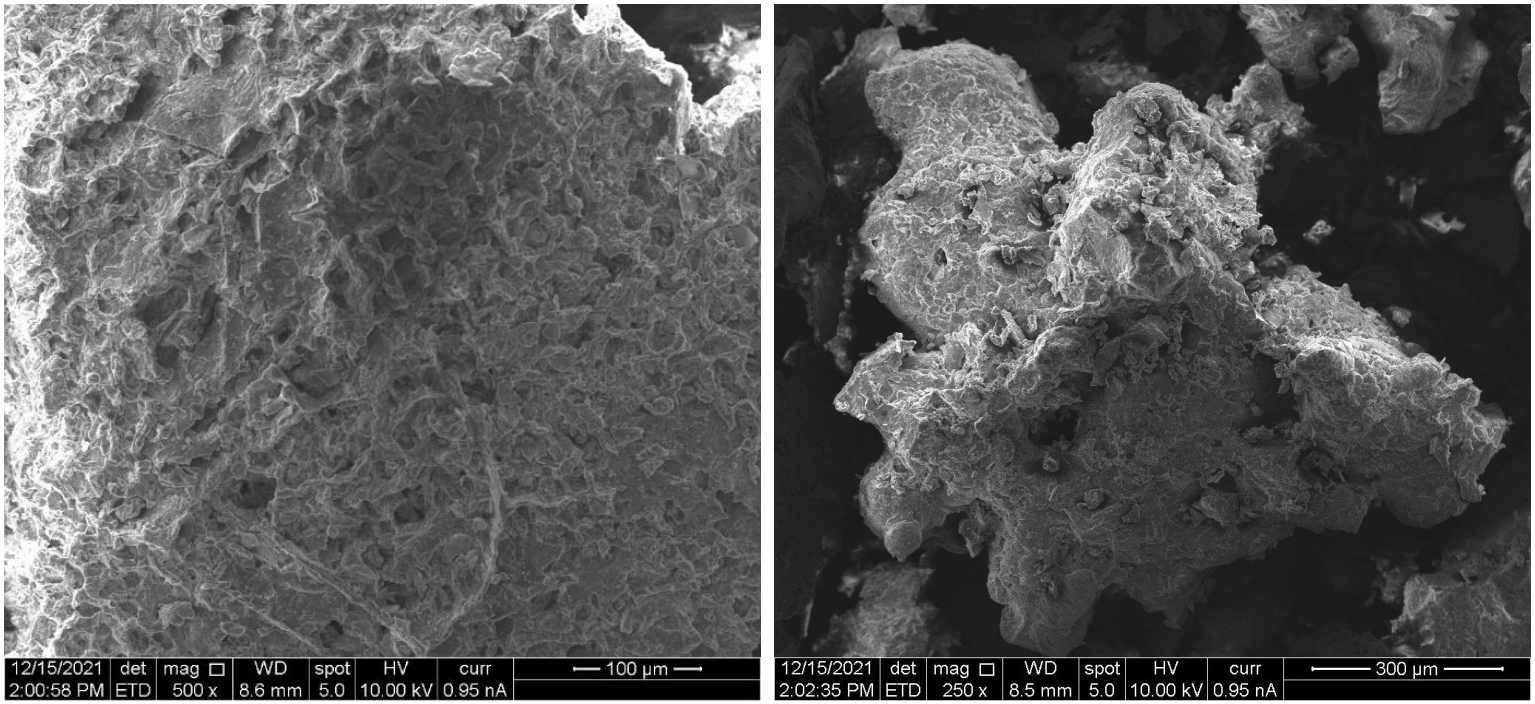
As cápsulas liofilizadas apresentam um formato esférico irregular com concavidades e rugas visíveis (aspecto de estruturas amassadas) (Fig. 5 C-D). Não houve rompimento, aparecimento de poros, de estruturas ocas e as cápsulas não estavam grudadas umas nas outras indicando resistência considerável do material de revestimento a secagem por liofilização. Tais aspectos diferem de outros resultados trabalhos que relatam que a secagem por liofilização ocasiona aspectos de estruturas rompidas (semelhantes a cacos de vidro) e perda da característica esférica (Corrêa et al., 2023; Giroldi et al., 2022; Ma et al., 2014)

Pode ser observado que a adição do revestimento ocasionou uma superfície mais regular, mais esférica e rugosidades semelhantes as estruturas globulares das proteínas. A interação destas com o alginato de sódio resultou na formação de uma camada protetora viscosa e uniforme com aumento do diâmetro, que passou de 1158,62 mm (não revestida) para 1413,79 mm (com revestimento) similar ao observado por Krunić & Rakin (2022) na encapsulação de probióticos com alginato e soro do leite concentrado.

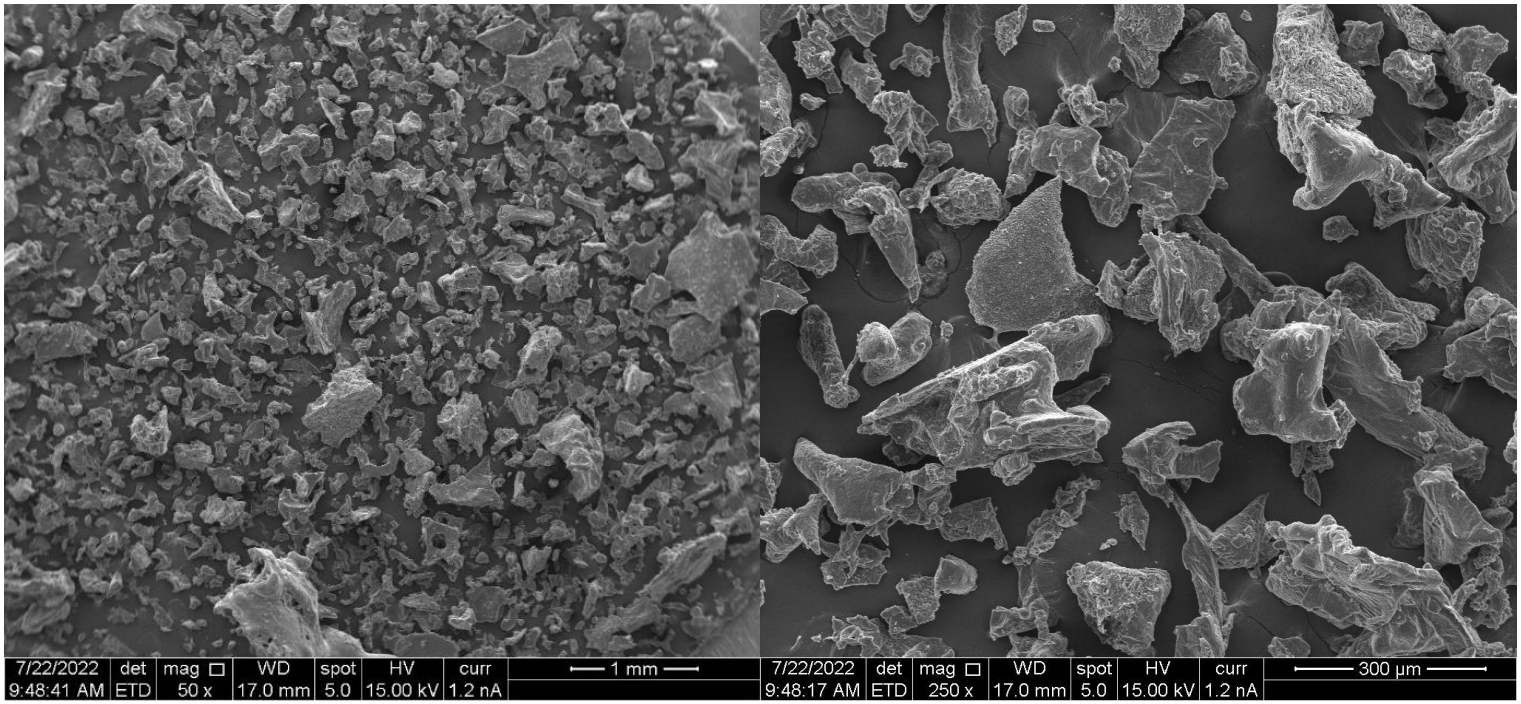
.

Figura 5. Caracterização da morfologia das partículas

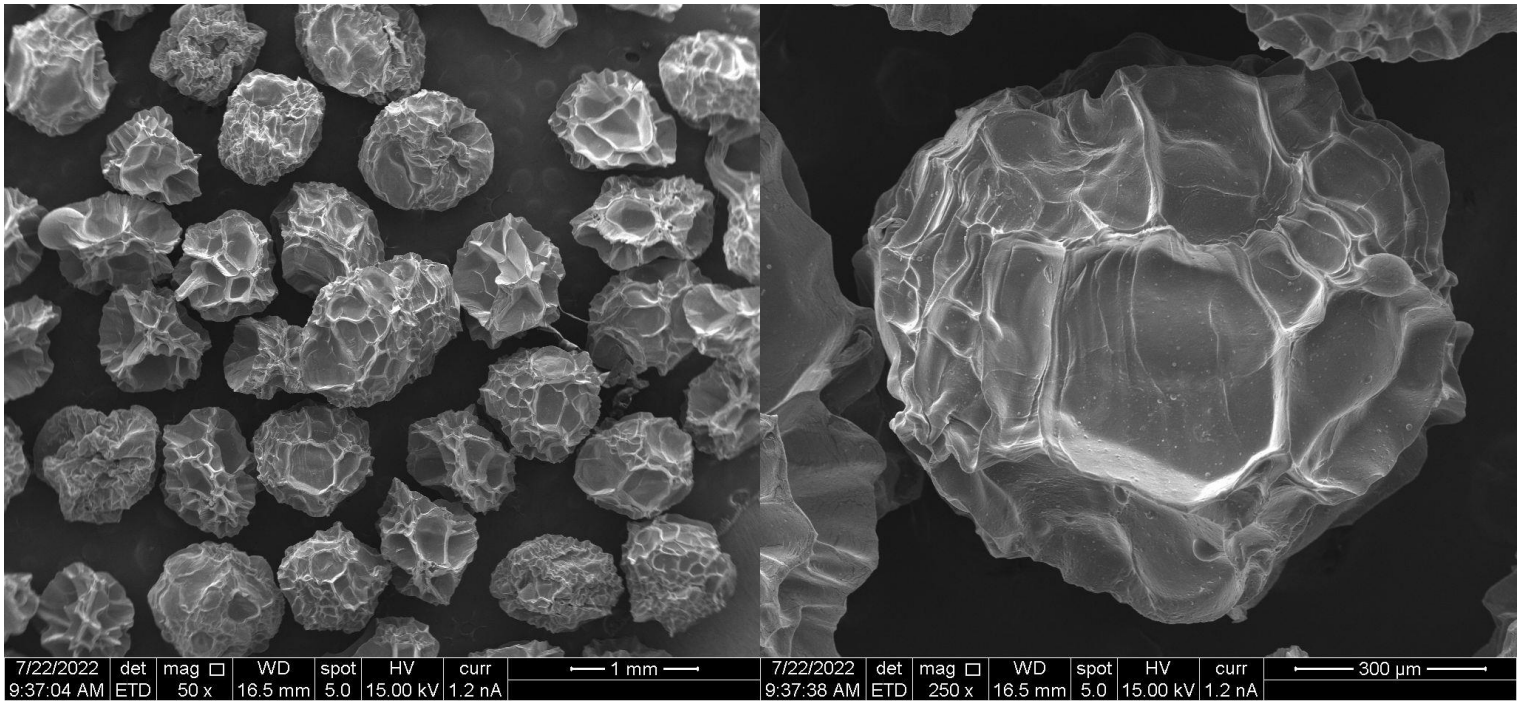
(A)



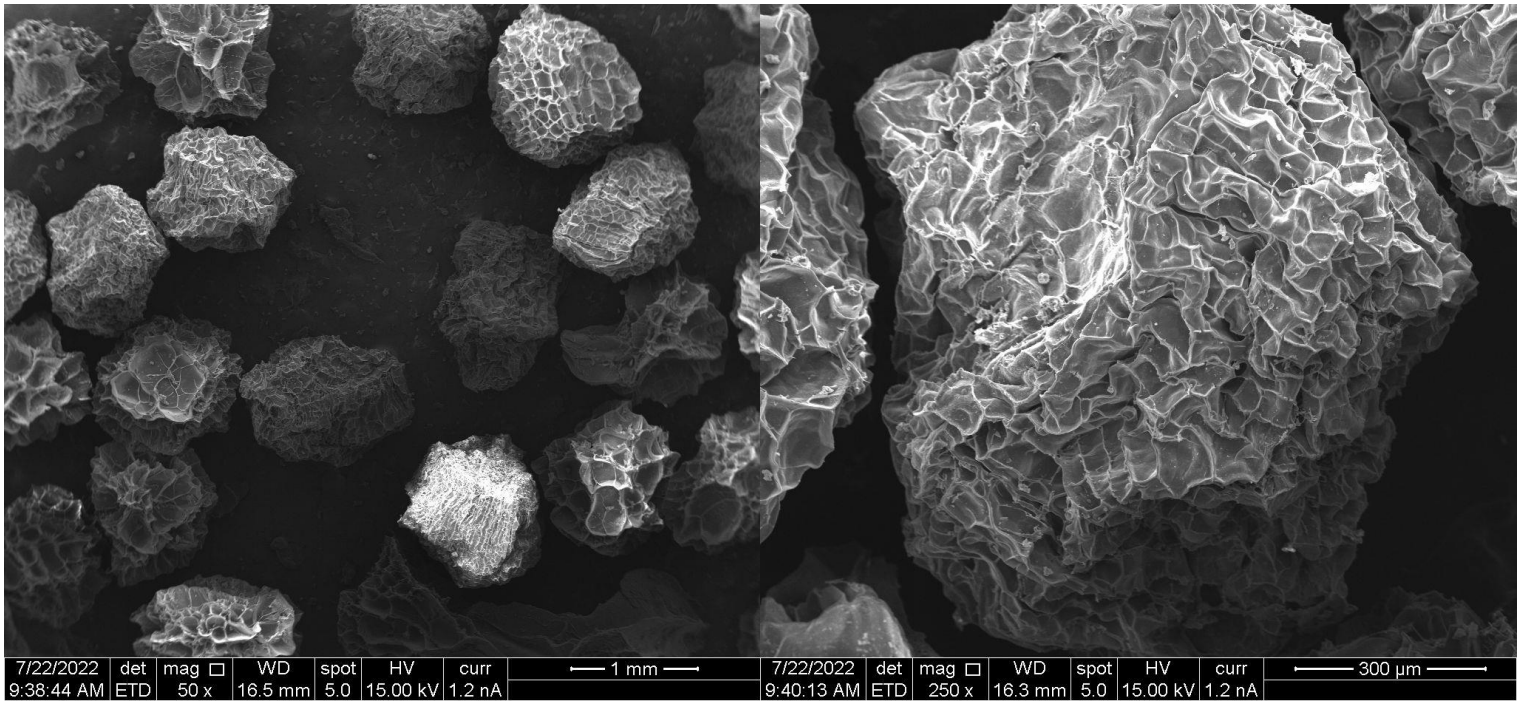
(B)


7/22/2022 9:48:41 AM
det ETD
mag 50 x
WD 17.0 mm
spot 5.0
HV 15.00 kV
curr 1.2 nA
1 mm
7/22/2022 9:48:17 AM
det ETD
mag 250 x
WD 17.0 mm
spot 5.0
HV 15.00 kV
curr 1.2 nA
300 µm

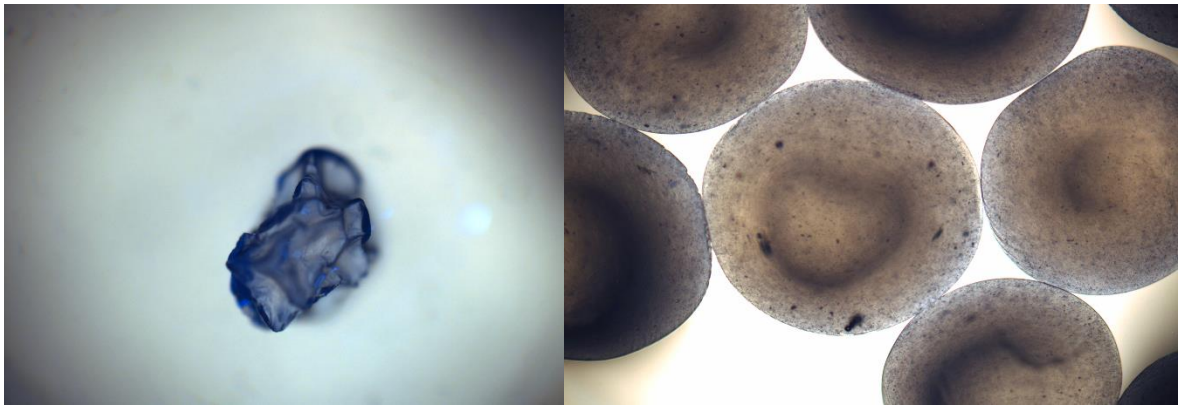
(C)


7/22/2022 9:37:04 AM
det ETD
mag 50 x
WD 16.5 mm
spot 5.0
HV 15.00 kV
curr 1.2 nA
1 mm
7/22/2022 9:37:38 AM
det ETD
mag 250 x
WD 16.5 mm
spot 5.0
HV 15.00 kV
curr 1.2 nA
300 µm

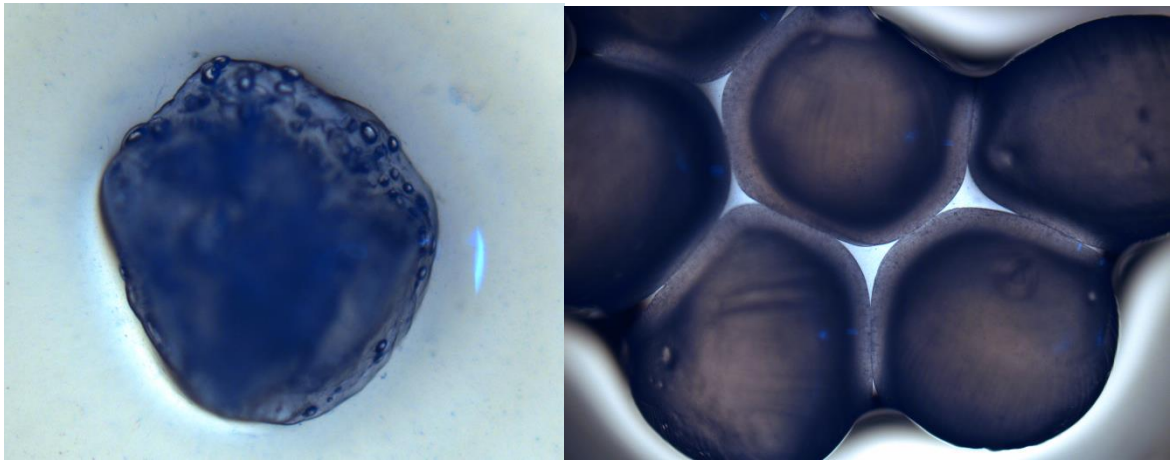
(D)


7/22/2022 9:38:44 AM
det ETD
mag 50 x
WD 16.5 mm
spot 5.0
HV 15.00 kV
curr 1.2 nA
1 mm
7/22/2022 9:40:13 AM
det ETD
mag 250 x
WD 16.3 mm
spot 5.0
HV 15.00 kV
curr 1.2 nA
300 µm

(E)



(F)



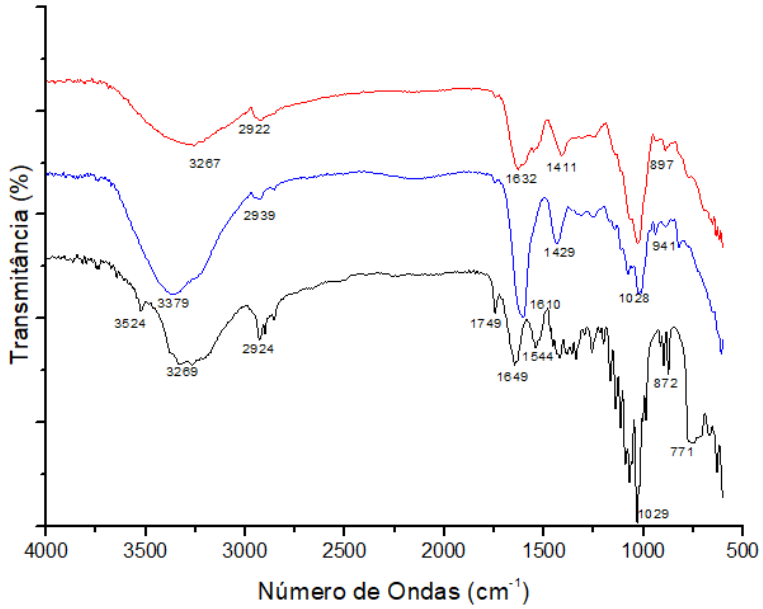
Microscopia eletrônica de varredura (A-D): Soro do leite caprino concentrado (A) Soro do leite caprino hidrolisado (B) Cápsula sem revestimento (C) Cápsula com revestimento (D); Microscopia ótica: Cápsula sem revestimento (E) Cápsula com revestimento (F)

A elevada higroscopicidade de hidrolisados proteicos é uma das desvantagens de aplicação destas partículas na formulação de novos produtos pois limita a fluidez do material e a estabilidade de armazenamento (SARABANDI et al., 2018). A encapsulação mostrou ser um tratamento eficiente para reduzir a aw e a higroscopicidade do hidrolisado proteico (Tabela 5) para valores condizentes com uma boa estabilidade microbiológica (<0,6) podendo ser uma alternativa efetiva na aplicação prática destes compostos bioativos, na indústria e/ou como nutracêutico.

Adicionar um revestimento proteico influenciou nos valores de atividade de água e de higroscopicidade, pois, todos os tratamentos apesar de terem adsorvido água do sistema, após 7 dias sob umidade saturada, T2 absorveu mais água do que a cápsula não revestida ($p<0,05$). Esse comportamento pode ser devido a exposição de grupos proteicos hidrofóbicos que aumentaram a espessura do material encapsulante, similar ao visto por por Ma et al., (2014).

A análise de FTIR (Fig. 6) possibilita o estudo de interações intermoleculares como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, atrações eletrostáticas e forças de Van Der Waals que auxiliam na estabilidade das cápsulas (Bora et al., 2023).

Figura 6. Espectros de FTIR das cápsulas e do hidrolisado livre.



(▬) WPH; (▬) T2, cápsula sem revestimento (▬) T3 cápsula com revestimento

O soro do leite hidrolisado não encapsulado mostrou o aparecimento de características correspondentes a grupos de hidroxila em torno de 2922 a 3267, este pico foi atribuído à presença de trechos de amina. Os picos referentes aos grupos Amida I (1411 e 1632) e II (897) também foram identificados, resultados semelhantes aqueles identificados para proteína do soro do leite de cabra (Du, Huang, et al., 2022)

Para as amostras encapsuladas observou-se o aparecimento de picos relativos aos grupos hidroxila em 3379 (CSR) e 3267 (CCR) correspondentes a interação entre grupos amina e os radicais hidroxila. O pico mais estreito identificado no tratamento com adição do revestimento é característico da formação de pontes de hidrogênio entre o material encapsulado e o agente encapsulante, resultados semelhantes foram encontrados por Bora et al. (2023) e Florentino et al. (2022).

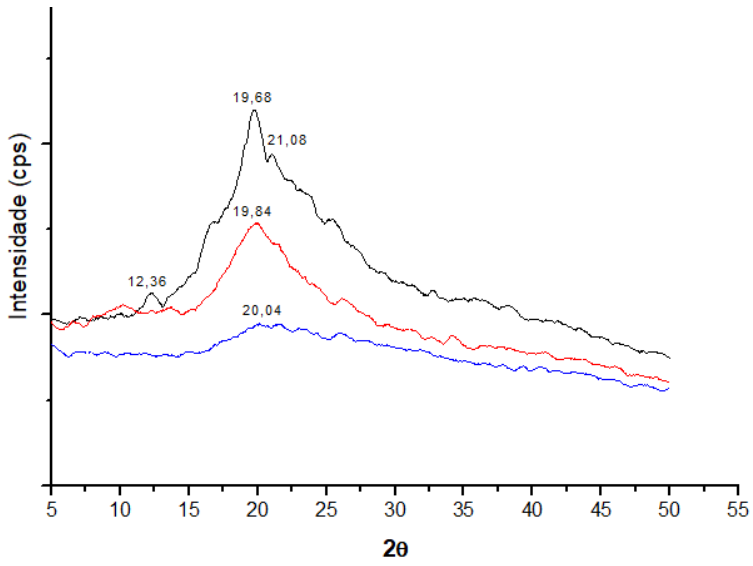
As frequências de absorção de amida I, amida II e amida III foram 1649, 1544 e 1029 cm^{-1}, respectivamente para o hidrolisado livre, 1610, 1429 e 1028 para a cápsula sem revestimento e 1632, 1411 e 897 para a cápsula com revestimento. Essa alteração nas absorções pode ser consequência da diminuição de folhas β na estrutura da proteína (evidenciado nos resultados de CD) levando a exposição de locais hidrofóbicos e alterando interações com o alginato de sódio, um polissacarídeo.

A produção de picos relacionados a essas porções indica também a presença de grupamentos específicos, sendo estes a vibração de estiramento CH_2 assimétrica (Amida B), vibração de estiramento C═O (Amida I), vibração de flexão CH_2, vibração de estiramento CN (Amida II), e a banda amida III produzida por vibração oscilatória de CH_2 (Florentino et al., 2022; Ochoa-Yepes et al., 2019). Observamos picos intensos sobrepostos entre o grupamento amino funcional (amida I e II) em T3 e o grupo carboxil o que ocorre devido a interações eletrostáticas entre grupos carboxila carregados negativamente (COO^-) da solução de alginato e grupos aminos carregados positivamente (NH_3^+) presente nos grupamentos proteicos.

A análise de difração de raios X foi empregada com intuito de investigar a estrutura cristalina e o rearranjo atômico das cápsulas produzidas. Os espectros obtidos (Figura 7) mostram que todos os materiais testados apresentam padrões de cristalinidade, mas exibiram diferenças na intensidade dos picos. Os difratogramas do soro hidrolisado e da cápsula com revestimento exibiram picos mais intensos e consequentemente apresentam um padrão cristalino mais forte do que a cápsula sem revestimento. A maior cristalinidade das estruturas está relacionada ao uso da proteína do soro do leite (na sua forma hidrolisada ou como revestimento), semelhante ao que foi observado por Solghi et al. (2020)

Muitos picos com padrão de cristalinidade podem ser observados para o soro do leite hidrolisado, que exibiu 3 picos intensos em 12,36°, 19,68° e 21,08°. Com a encapsulação os picos diminuíram a frequência e a intensidade, porém na cápsula sem revestimento um pico em 20,04° foi identificado, sendo mais largo quando comparado as outras amostras, indicando que as cápsulas têm tendência a um padrão mais amorfo. A capsula que não foi revestida, apresentou regiões amorfas com tendencia a deformação, maciez e maior adesão o que corrobora com a maior higroscopicidade deste tratamento e a caracterização morfológica que exibiu maiores deformidades (NOGUEIRA; MARTINS, 2019).

Figura 7. Difratograma de DRX das cápsulas e do hidrolisado livre



(▬) WPH; (▬) T2, cápsula sem revestimento (▬) T3 cápsula com revestimento

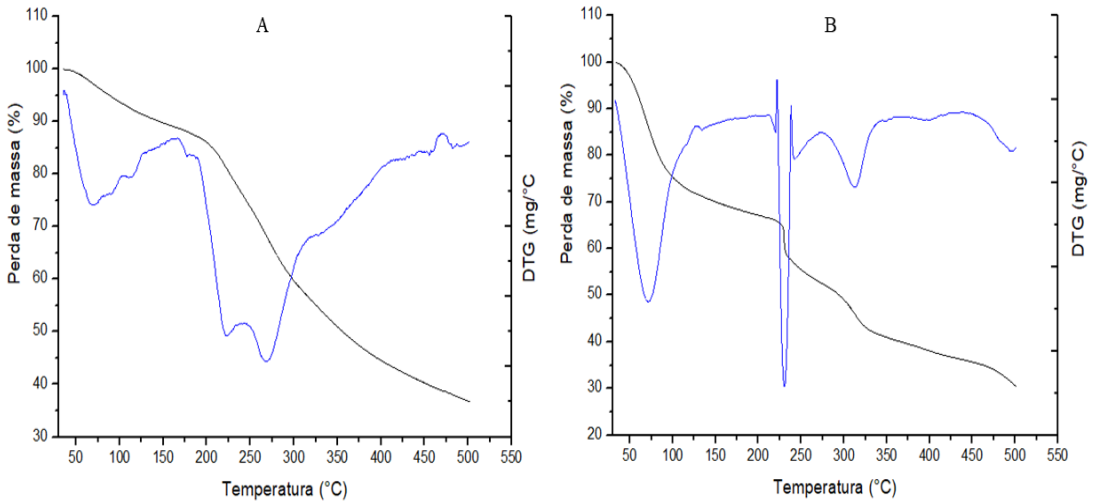
3.9. Estabilidade térmica das cápsulas contendo soro do leite hidrolisado

As variações de estabilidade térmica das cápsulas foram investigadas por análise de TGA (Fig. 8). De acordo com os padrões de perda de massa alguns estágios de degradação podem ser vistos: até 120 °C corresponde à perda física de água das amostras, já entre 120 e 260 °C é relativo à decomposição das ligações proteicas e na faixa de 260–500 °C ocorre decomposição térmica da matéria orgânica ou resíduos carbonáceos inertes.

De acordo com a figura 8 há uma tendência de degradação das cápsulas em função do aumento da temperatura, porém com comportamentos distintos entre os tratamentos. A cápsula sem revestimento exibiu um padrão de decomposição em uma série de etapas consecutivas exibindo a perda de massa mais intensa em de 200-250 ºC, provavelmente devido a rápida degradação térmica do alginato nos estágios finais da degradação (Volić et al., 2022) .

A adição do revestimento proporcionou certa estabilidade térmica (houve menor % de perda de massa nos primeiros 100 ºC) e retardou a degradação completa da estrutura. Este efeito pode estar correlacionado com a interação proteína/carboidrato formando um complexo mais estável e reduzindo a perda de peso em função do calor, além disso a característica globular das proteínas do soro do leite pode ter conferido uma maior resistência térmica (Falsafi et al., 2022).

Figura 8. Padrão de perda de massa em função da temperatura



Análise termogravimétrica de (A) cápsula com revestimento e (B) cápsula sem revestimento

3.10. Digestão gastrointestinal simulada in vitro

A tabela 5 exibe os resultados da cinética de liberação dos peptídeos de acordo com as fases da digestão. Para todos os tratamentos a fase oral não apresentou alta intensidade de degradação dos peptídeos ou das cápsulas, fato que pode ser atribuído ao pouco tempo de permanência nessa fase (2 min) e a afinidade de atuação da amilase salivar. A quantidade de proteína para a cápsula não revestida apresentou um pequeno aumento, enquanto que não houveram mudanças na quantidade de proteína na cápsula sem revestimento. Tal comportamento pode ser atribuído à interação da solução de revestimento com o alginato conferindo assim menor potencial de degradação desse polissacarídeo frente a enzima com especificidade por carboidratos.

Tabela 5. Caracterização do soro do leite hidrolisado e encapsulado e cinética de liberação de proteínas das frações digeridas

			Amostras						
			WPH	T2	T3		WPH	T2	T3
Fase da digestão	Não digerida	Proteína (mg.mL)	12,01 ± 0,02[a]	0,48± 0,05[b]	0,24 ± 0,03[c]	% de inibição DPPH	27,54± 0,01[a]	1,68± 0,03[c]	2,19± 0,07[b]
	Oral		11,7 ± 0,01[a]	0,98 ± 0,01[b]	0,24 ± 0,02[c]		26,44± 0,04[a]	1,62± 0,02[c]	2,14± 0,01[b]
	Gástrica		9,92± 0,02 [a]	5,52± 0,01[b]	2,23± 0,02[c]		22,12± 0,02[a]	14,32± 0,05[b]	8,67± 0,08[c]
	Intestinal		1,78± 0,02[c]	3,98± 0,04[b]	9,54 ± 0,01[a]		4,02± 0,01[a]	8,81± 0,01[c]	17,23± 0,04[b]
Bioacessibilidade proteica (%)			94,2 ±0,05[a]	80,5± 0,029[c]	92,45± 0,01[b]		-	-	-
Atividade de água inicial			0,253 ± 0,01[a]	0,164 ± 0,01[b]	0,122 ± 0,03[c]		-	-	-
Higroscopicidade			75,14 ± 0,01[a]	35,99 ± 0,03[b]	16,28 ± 0,01[c]		-	-	-
Atividade de água final*			478,72 ± 0,02[a]	328,72 ± 0,01[b]	252,06 ± 0,02[c]		-	-	-

WPH – Soro do leite hidrolisado; T2 - Cápsula sem revestimento liofilizada; T3 - Cápsula com revestimento liofilizada; *Atividade de água após 07 dias. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha representam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Todos os resultados foram realizados em triplicata e avaliados quanto a diferença utilizando o Teste de Tukey com 5% de significância

Conforme prosseguiu-se com as fases da digestão a amostra do soro do leite hidrolisada não encapsulada teve a quantidade de proteína diminuída conforme o contato com os fluidos gástricos e intestinais. Efeito ocasionado devido a maior digestibilidade da proteína hidrolisada, onde as condições gastrointestinais resultaram na digestibilidade dos fragmentos proteicos gerando frações menores e aminoácidos livres para serem absorvidos no ambiente intestinal.

Um dos maiores desafios na aplicação de hidrolisados proteicos é assegurar a absorção intestinal preservando o desempenho da bioatividade. A encapsulação mostrou ser um tratamento eficaz para proteção da integridade do hidrolisado do soro do leite caprino e também para resguardar a bioatividade desta fração. Os resultados (Tabela 5) indicam que o tratamento com a solução de revestimento demonstrou ser mais eficaz no aprisionamento dos hidrolisados nas cápsulas na fase gástrica, a maior parte da liberação da proteína ocorrendo na fase intestinal.

A fase gástrica foi a que mais influenciou na degradação dos componentes, logo ao fim da fase intestinal as frações de proteínas hidrolisadas liberadas sofreram ainda mais degradação pelos fluidos intestinais e houve assim a diminuição na quantidade de proteína total obtida devido a produção de sequências ativas de aminoácidos.

A degradação e consequente liberação do hidrolisado das cápsulas influenciou a atividade antioxidante, conforme ocorreu o aumento da digestibilidade, houve maior liberação dos peptídeos na fase gástrica em T2 resultando no aumento da atividade antioxidante. Ao final da digestão houve diminuição da atividade antioxidante e prejuízo a bioatividade, provavelmente a degradação das sequencias e o aumento dos resíduos de aminoácidos livres ocasionaram tal fato.

A maior atividade antioxidante após a digestão foi encontrada para T3 o que corrobora com a maior proteção conferida as sequencias de proteínas, o que corrobora com Alvarado et al. (2019). Estes autores verificaram que a encapsulação foi um processo eficiente para proteção de bioativos, mas os agentes encapsulantes influenciavam no processo de liberação e na manutenção da bioatividade.

A bioacessibilidade proteica (BP*)* foi avaliada utilizando um modelo validado de bioacessibilidade eficaz para compreensão de modificações após condições de digestão simuladas. Uma vez que os hidrolisados proteicos têm um importante potencial nutracêutico que é diretamente influenciado pela bioacessibilidade mensurar esta capacidade é importante. Além disso, poucos trabalhos utilizaram esse protocolo com estes compostos livres ou encapsulados sendo mais comum a abordagem da bioacessibilidade de proteínas nativas após o processo de digestão (Ayala-Rodríguez et al., 2022; Liu et al., 2021; Xing et al., 2017).

O material não encapsulado apresentou a maior digestibilidade da amostra, uma vez que, quanto mais degradadas no processo de digestão maior a facilidade de serem absorvidas. A diferença entre a bioacessibilidade do material encapsulado pode estar relacionada ao tamanho das frações de peptídeos que foram liberadas ao fim da digestão, demonstrando que a cápsula com revestimento foi mais eficaz para proteção de frações de tamanho menores que ficaram retidas no interior do material dialisado.

CONCLUSÃO

O hidrolisado do soro do leite caprino foi encapsulado com êxito empregando alginato de sódio e um revestimento proteico utilizando um concentrado proteico do soro do leite caprino. A adição de um revestimento proteico influenciou positivamente nas características das cápsulas, conferindo uma camada protetora, diminuindo as deformidades e evitando o rompimento das estruturas. As propriedades tecnológicas e biológicas avaliadas revelaram que o material encapsulado foi preservado e apresentou estabilidade à digestão gastrointestinal obtendo-se frações bioacessíveis que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos produtos com potencial benefício a saúde. Os resultados deste trabalho comprovam que a encapsulação é uma tecnologia válida para a encapsulação frações proteicas hidrolisadas e bioativas podendo ser uma estratégia promissora para aplicação destes compostos na indústria de alimentos ou de nutracêuticos, como um ingrediente alimentar com características simultaneamente tecnológicas e funcionais. Porém são necessários estudos futuros que possam avaliar a estabilidade destas cápsulas inseridas em uma matriz alimentar e por um período de armazenamento e assim estimular novas maneiras de aplicabilidade de hidrolisados proteicos do soro do leite caprino.

Funding: Este trabalho foi financiado pelo Instituto de desenvolvimento em pesquisa-IDEP da Universidade Federal da Paraíba e pela Coordenação de aperfeiçoamento pessoal CAPES a partir da concessão de bolsas de estudo

Declaration of competing interest: Os autores declaram que não há conflito de interesses

CRediT authorship contribution statement

Maria Isabel Ferreira Campos: Formal analysis, Investigation, Data curation, Methodology, Investigation, Writing-original draft, Conceptualization, Writing– review & editing, Ana Karolina de Sousa Lima: Formal analysis, Investigation, Data curation, José Honório Pereira Lopes Neto: Formal analysis, Investigation, Data curation, Kerolayne Santos Leite: Formal analysis, Investigation, Data curation Julia Mariano Caju de Oliveira: Formal analysis, Investigation, Data curation; Fábio Florença Cardoso Formal analysis, Investigation, Data curation, Marcos Roberto de Mattos Fontes Formal analysis, Investigation, Data curation, Cristiani Viegas Brandão Grisi Investigation, Data curation, Carlos Alberto de Almeida Gadelha: Project administration, Methodology, Tatiane Santi Gadelha: Project administration, Supervision, Writing– review & editing, Funding acquisition.

HIGHLIGHTS

- Encapsulação de um hidrolisado obtido a partir das proteínas do soro do leite de cabra
- Avaliação da digestibilidade e da bioacessibilidade in vitro
- Soro do leite concentrado como um revestimento protetor para frações de menor peso molecular bioativas
- A secagem por liofilização não causou rompimento das cápsulas e efeito de cacos de vidro em MEV promovendo estabilidade e liberação gradual dos materiais do núcleo

REFERÊNCIAS

Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *37*, 84–90.

https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010

Accardo, F., Leni, G., Tedeschi, T., Prandi, B., & Sforza, S. (2022). Structural and chemical changes induced by temperature and pH hinder the digestibility of whey proteins. *Food Chemistry*, *387*, 132884. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132884

Aguilar-Toalá, J. E., Quintanar-Guerrero, D., Liceaga, A. M., & Zambrano-Zaragoza, M. L. (2022). Encapsulation of bioactive peptides: a strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. *RSC Advances*, *12*(11), 6449–6458. https://doi.org/10.1039/D1RA08590E

Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, *74*, 80–88. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032

Alvarado, Y., Muro, C., Illescas, J., Díaz, M. del C., & Riera, F. (2019). Encapsulation of antihypertensive peptides from whey proteins and their releasing in gastrointestinal conditions. *Biomolecules*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/biom9050164

Ayala-Rodríguez, V. A., López-Hernández, A. A., López-Cabanillas Lomelí, M., González-Martínez, B. E., & Vázquez-Rodríguez, J. A. (2022). Nutritional quality of protein flours of fava bean (Vicia faba L.) and in vitro digestibility and bioaccesibility. *Food Chemistry: X*, *14*, 100303. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100303

Ballatore, M. B., Bettiol, M. del R., Vanden Braber, N. L., Aminahuel, C. A., Rossi, Y. E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A. (2020). Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry*, *319*(July 2019), 126472. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472

Bora, A. F. M., Kouame, K. J. E. P., Li, X., Liu, L., Sun, Y., Ma, Q., & Liu, Y. (2023). Development, characterization and probiotic encapsulating ability of novel Momordica charantia bioactive polysaccharides/whey protein isolate composite gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *225*(600), 454–466. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.097

Boscaini, S., Skuse, P., Nilaweera, K. N., Cryan, J. F., & Cotter, P. D. (2023). The 'Whey' to good health: Whey protein and its beneficial effect on metabolism, gut microbiota and mental health. *Trends in Food Science & Technology*, *133*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.12.009

Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *254*, 248–254.

Bustamante, S. Z., González, J. G., Sforza, S., & Tedeschi, T. (2021). Bioactivity and peptide profile of whey protein hydrolysates obtained from Colombian double-cream cheese production and their products after gastrointestinal digestion. *LWT*, *145*, 111334. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111334

Caessens, P. W. J. R., Gruppen, H., Visser, S., van Aken, G. A., & Voragen, A. G. J. (1997). Plasmin Hydrolysis of β-Casein: Foaming and Emulsifying Properties of the Fractionated Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(8), 2935–2941. https://doi.org/10.1021/jf9700889

Cai, Y. Z. P. and P. of S., & Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried. *Journal*

of Food Science, *65*(3600), 1248–1252.

Campos, M. I. F., Barbosa, P. P. de S., Camargo, L. J., Pinto, L. D. S., Mataribu, B., Serrão, C., Marques-Santos, L. F., Lopes, J. H., Oliveira, J. M. C. de, Gadelha, C. A. de A., & Santi-Gadelha, T. (2022). Characterization of goat whey proteins and their bioactivity and toxicity assay. *Food Bioscience*, *46*, 101591. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101591

Cardoso, F. F., Gomes, A. A. S., Dreyer, T. R., Cavalcante, W. L. G., Dal Pai, M., Gallacci, M., & Fontes, M. R. M. (2020). Neutralization of a bothropic PLA2-like protein by caftaric acid, a novel potent inhibitor of ophidian myotoxicity. *Biochimie*, *170*, 163–172. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.01.010

Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, *10*(11), 1738. https://doi.org/10.3390/nu10111738

Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E., & López-Fandiño, R. (2009). Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocolloids*, *23*(3), 593–599. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.001

Corrêa, A. P. F., Veras, F. F., Lago, C. C., Noreña, C. P. Z., & Brandelli, A. (2023). Microencapsulation upholds biological activities of sheep whey hydrolysates and protects against in vitro gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, *138*, 105554. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105554

Costa, T. R., Francisco, A. F., Cardoso, F. F., Moreira-Dill, L. S., Fernandes, C. A. H., Gomes, A. A. S., Guimarães, C. L. S., Marcussi, S., Pereira, P. S., Oliveira, H. C., Fontes, M. R. M., Silva, S. L., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2021). Gallic acid anti-myotoxic activity and mechanism of action, a snake venom phospholipase A2 toxin inhibitor, isolated from the medicinal plant Anacardium humile. *International Journal of Biological Macromolecules*, *185*, 494–512. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.163

de Araújo Etchepare, M., Nunes, G. L., Nicoloso, B. R., Barin, J. S., Moraes Flores, E. M., de Oliveira Mello, R., & Ragagnin de Menezes, C. (2020). Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. *Lwt*, *117*(November 2018), 108601. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108601

de Souza, R. S. C., Tonon, R. V., Stephan, M. P., Silva, C. M., Penteado, A. L., Cabral, L. M. C., & Kurozawa, L. E. (2019). Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. *Brazilian Journal of Food Technology*, *22*. https://doi.org/10.1590/1981-6723.02118

dos Santos, W. M., Guimarães Gomes, A. C., de Caldas Nobre, M. S., de Souza Pereira, Á. M., dos Santos Pereira, E. V., dos Santos, K. M. O., Florentino, E. R., & Alonso Buriti, F. C. (2023). Goat milk as a natural source of bioactive compounds and strategies to enhance the amount of these beneficial components. *International Dairy Journal*, *137*, 105515. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105515

Du, X., Huang, X., Wang, L., Mo, L., Jing, H., Bai, X., & Wang, H. (2022). Nanosized niosomes as effective delivery device to improve the stability and bioaccessibility of goat milk whey protein peptide. *Food Research International*, *161*, 111729. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111729

Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X., & Wang, H. (2022). Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey

protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT*, *159*, 113257. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113257

Embiriekah, S., Bulatović, M., Borić, M., Zarić, D., & Rakin, M. (2018). Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey protein hydrolysates. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(1), 243–252. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12428

Falsafi, S. R., Rostamabadi, H., Nishinari, K., Amani, R., & Jafari, S. M. (2022). The role of emulsification strategy on the electrospinning of β-carotene-loaded emulsions stabilized by gum Arabic and whey protein isolate. *Food Chemistry*, *374*, 131826. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131826

Feng, C., Tian, L., Hong, H., Wang, Q., Zhan, X., Luo, Y., & Tan, Y. (2022). In Vitro Gut Fermentation of Whey Protein Hydrolysate: An Evaluation of Its Potential Modulation on Infant Gut Microbiome. *Nutrients*, *14*(7), 1374. https://doi.org/10.3390/nu14071374

Florentino, G. I. B., Lima, D. A. S., Santos, M. M. F., Ferreira, V. C. da S., Grisi, C. V. B., Madruga, M. S., & da Silva, F. A. P. (2022). Characterization of a new food packaging material based on fish by-product proteins and passion fruit pectin. *Food Packaging and Shelf Life*, *33*(February). https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100920

Giroldi, M., Grambusch, I. M., Schlabitz, C., Kuhn, D., Lehn, D. N., & Volken de Souza, C. F. (2022). Encapsulation of protein hydrolysates by spray drying: feasibility of using buffalo whey proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, *57*(6), 3419–3427. https://doi.org/10.1111/ijfs.15665

Grabner, A. N., Alfonso, J., Kayano, A. M., Moreira-Dill, L. S., dos Santos, A. P. de A., Caldeira, C. A. S., Sobrinho, J. C., Gómez, A., Grabner, F. P., Cardoso, F. F., Zuliani, J. P., Fontes, M. R. M., Pimenta, D. C., Gómez, C. V., Teles, C. B. G., Soares, A. M., & Calderon, L. A. (2017). BmajPLA 2 -II, a basic Lys49-phospholipase A 2 homologue from Bothrops marajoensis snake venom with parasiticidal potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, *102*, 571–581. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.013

Heppell, L. M. J., Cant, A. J., & Kilshaw, P. J. (1984). Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment: a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *British Journal of Nutrition*, *51*(1), 29–36. https://doi.org/10.1079/BJN19840006

Herreman, L., Nommensen, P., Pennings, B., & Laus, M. C. (2020). Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Science & Nutrition*, *8*(10), 5379–5391. https://doi.org/10.1002/fsn3.1809

Hossain, H., Jahan, I. A., Nimmi, I., & Hasan, K. (2012). Evaluation of Antinociceptive and Antioxidant Potential from the Leaves of Spilanthes paniculata Growing in Bangladesh. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, *1*(178), 178–186.

Hussein, F. A., Chay, S. Y., Zarei, M., Auwal, S. M., Hamid, A. A., Wan Ibadullah, W. Z., & Saari, N. (2020). Whey Protein Concentrate as a Novel Source of Bifunctional Peptides with Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Properties: RSM Study. *Foods*, *9*(1), 64. https://doi.org/10.3390/foods9010064

Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food*

Engineering, *121*, 15–23. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.012

John, J. A., & Ghosh, B. C. (2021). Production of whey protein hydrolyzates and its incorporation into milk. *Food Production, Processing and Nutrition*, *3*(1). https://doi.org/10.1186/s43014-021-00055-z

Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(2), 535–547. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4

Kheroufi, A., Brassesco, M. E., Campos, D. A., Boughellout, H., & Pintado, M. E. (2022). Functional properties of peptides obtained from whey proteins by ficin extract hydrolysis. *Food Bioscience*, *47*, 101707. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101707

Kheroufi, A., Brassesco, M. E., Campos, D. A., Mouzai, A., Boughellouta, H., & Pintado, M. E. (2022). Whey protein-derived peptides: The impact of chicken pepsin hydrolysis upon whey proteins concentrate on their biological and technological properties. *International Dairy Journal*, *134*, 105442. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105442

Krunić, T. Ž., Obradović, N. S., & Rakin, M. B. (2019). Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. *Food Chemistry*, *293*, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.062

Krunić, T. Ž., & Rakin, M. B. (2022). Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: Impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages. *Food Chemistry*, *370*, 130931. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130931

Lakowicz, J. R. (1983). Protein Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 341–381). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7658-7_11

Li, R., Lund, P., Nielsen, S. B., & Lund, M. N. (2022). Formation of whey protein aggregates by partial hydrolysis and reduced thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, *124*, 107206. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107206

Liu, F., Kariluoto, S., Edelmann, M., & Piironen, V. (2021). Bioaccessibility of folate in faba bean, oat, rye and wheat matrices. *Food Chemistry*, *350*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129259

Lopes Neto, J. H. P., Santos, M. C. G. D., Leite, K. S., Silva, L. A. D., Campos, M. I. F., Silveira, E. S. D., Amaral, J. B. S., Madruga, M. S., Braga, A. L. M., & Cardarelli, H. R. (2021). Development and characterization of Lactobacillus acidophilus (LA-3) microparticles with reducing substances and its addition to Reino cheese. *LWT*, *143*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111083

Lupas, A. N., Bassler, J., & Dunin-Horkawicz, S. (2017). *The Structure and Topology of α-Helical Coiled Coils* (pp. 95–129). https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_4

Ma, J.-J., Mao, X.-Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S.-W., & Li, Y.-H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT - Food Science and Technology*, *56*(2), 296–302. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.019

Machado, T. A. D. G., de Oliveira, M. E. G., Campos, M. I. F., de Assis, P. O. A., de Souza, E. L., Madruga, M. S., Pacheco, M. T. B., Pintado, M. M. E., & Queiroga, R. D. C. R. D. E.

(2017). Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic Lactobacillus acidophilus. *LWT - Food Science and Technology*, *80*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.013

Magro, A., Silva, M., Sousa, G., Cardoso, F., Guimarães, G., Muniz, S., Sarnighausen, V., Fontes, M., & Simões, R. (2020). Development of a low-cost colorimeter-like for undergraduate classes using microcontroller board and RGB LED. *Educación Química*, *31*(1), 36. https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2020.1.68349

Maqsoudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mohebodini, H., & Koushki, V. (2020). Stability and structural properties of bee pollen protein hydrolysate microencapsulated using maltodextrin and whey protein concentrate. *Heliyon*, *6*(5), e03731. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03731

Medeiros, G. K. V. V., Queiroga, R. C. R. E., Costa, W. K. A., Gadelha, C. A. A., e Lacerda, R. R., Lacerda, J. T. J. G., Pinto, L. S., Braganhol, E., Teixeira, F. C., Paula, P. P., Campos, M. I. F., Gonçalves, G. F., Pessôa, H. L. F., & Gadelha, T. S. (2018). Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, *113*, 116–123. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.200

Miles, A. J., Ramalli, S. G., & Wallace, B. A. (2022). <scp>DichroWeb</scp> , a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, *31*(1), 37–46. https://doi.org/10.1002/pro.4153

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, *5*(6), 1113–1124. https://doi.org/10.1039/C3FO60702J

Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. *Dairy*, *1*(3), 233–258. https://doi.org/10.3390/dairy1030016

Nasri, R., Hamdi, M., Touir, S., Li, S., Karra-Chaâbouni, M., & Nasri, M. (2021). Development of delivery system based on marine chitosan: Encapsulationand release kinetic study of antioxidant peptides from chitosan microparticle. *International Journal of Biological Macromolecules*, *167*, 1445–1451. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.098

Nogueira, D., & Martins, V. G. (2019). Use of Different Proteins to Produce Biodegradable Films and Blends. *Journal of Polymers and the Environment*, *27*(9), 2027–2039. https://doi.org/10.1007/s10924-019-01494-z

Ochoa-Yepes, O., Di Giogio, L., Goyanes, S., Mauri, A., & Famá, L. (2019). Influence of process (extrusion/thermo-compression, casting) and lentil protein content on physicochemical properties of starch films. *Carbohydrate Polymers*, *208*, 221–231. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.030

Oliveira Lima, K., Alemán, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. del C., Montero, M. P., Prentice, C., Taipe Huisa, A. J., & Monserrat, J. M. (2021). Characterization, stability, and in vivo effects in Caenorhabditis elegans of microencapsulated protein hydrolysates from stripped weakfish (Cynoscion guatucupa) industrial byproducts. *Food Chemistry*, *364*(February). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130380

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of

products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, *44*(6), 307–315. https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(3), 716–723. https://doi.org/10.1021/jf60217a041

Qi, P. X., & Onwulata, C. I. (2011). Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content. *Journal of Dairy Science*, *94*(5), 2231–2244. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3942

Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2020). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, *38*(1–2), 235–258. https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906

Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., Brito, E. S. de, Morais, S. M. de, Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico, 125 Embrapa*, 3–6.

Ryan, G., O'Regan, J., & FitzGerald, R. J. (2023). Foaming and sensory properties of bovine milk protein isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *International Dairy Journal*, *137*, 105511. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105511

Sarabandi, K., Gharehbeglou, P., & Jafari, S. M. (2020). Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. *Drying Technology*, *38*(5–6), 577–595. https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1689399

Sarabandi, K., & Jafari, S. M. (2020). Fractionation of Flaxseed-Derived Bioactive Peptides and Their Influence on Nanoliposomal Carriers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(51), 15097–15106. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02583

Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, *251*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004

Sarabandi, K., Sadeghi Mahoonak, A., Hamishekar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of Food Engineering*, *237*, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.036

Silvestre, M. P. C., Morais, H. A., Silva, V. D. M., & Silva, M. R. (2013). Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Nutrire*, *38*(3), 278–290. https://doi.org/10.4322/nutrire.2013.026

Singh, B. P., Aluko, R. E., Hati, S., & Solanki, D. (2022). Bioactive peptides in the management of lifestyle-related diseases: Current trends and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(17), 4593–4606. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1877109

Solghi, S., Emam-Djomeh, Z., Fathi, M., & Farahani, F. (2020). The encapsulation of curcumin by whey protein: Assessment of the stability and bioactivity. *Journal of Food Process Engineering*, *43*(6). https://doi.org/10.1111/jfpe.13403

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). 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*, *13*(6), 447–453. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0

Tarhan, O., Spotti, M. J., Schaffter, S., Corvalan, C. M., & Campanella, O. H. (2016). Rheological and structural characterization of whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, *61*, 211–220. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.042

Tondo, A. R., Caputo, L., Mangiatordi, G. F., Monaci, L., Lentini, G., Logrieco, A. F., Montaruli, M., Nicolotti, O., & Quintieri, L. (2020). Structure-Based Identification and Design of Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(2), 541–548. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06237

Tsermoula, P., Khakimov, B., Nielsen, J. H., & Engelsen, S. B. (2021). WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 230–241. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025

Volić, M., Pećinar, I., Micić, D., Đorđević, V., Pešić, R., Nedović, V., & Obradović, N. (2022). Design and characterization of whey protein nanocarriers for thyme essential oil encapsulation obtained by freeze-drying. *Food Chemistry*, *386*, 132749. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132749

Wang, Y.-Y., Wang, C.-Y., Wang, S.-T., Li, Y.-Q., Mo, H.-Z., & He, J.-X. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (Paeonia suffruticosa Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. *Food Chemistry*, *345*, 128765. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128765

Wei, Y., Cai, Z., Wu, M., Guo, Y., Tao, R., Li, R., Wang, P., Ma, A., & Zhang, H. (2020). Comparative studies on the stabilization of pea protein dispersions by using various polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *98*, 105233. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105233

Xing, G., Rui, X., Wang, D., Liu, M., Chen, X., & Dong, M. (2017). Effect of Fermentation pH on Protein Bioaccessibility of Soymilk Curd with Added Tea Polyphenols As Assessed by in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(50), 11125–11132. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04456

Zheng, Z., Li, J., Li, J., Sun, H., & Liu, Y. (2019). Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes. *Food Hydrocolloids*, *97*, 105222. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105222

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho o planejamento experimental da hidrólise com pepsina foi efetivo para melhorar as características dos hidrolisados da proteína do soro do leite de cabra. O pH em torno de 2,25 e o tempo de 150 min foram mais influentes no grau de hidrólise obtendo-se peptídeos com propriedades tecnológicas e bioativas de grande interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica. A partir da avaliação morfológica e funcional dos hidrolisados, podemos verificar que houve a obtenção de peptídeos com capacidade antioxidante e ansiolítica, o que pode tornar o hidrolisado do soro do leite caprino como uma alternativa para abordagem terapêuticas dessas desordens.

A partir dos dados in sílico 4 sequencias potencialmente bioativas foram verificadas, sendo estas: KALPMHIRL: (atividade anti-hipertensiva e antidiabética, respectivamente), DTDYKKYLL atividade antioxidante, AFNPTQL antidiabética; PMHIRL neuropeptídeo e DTDYKKYLLF com efeito opióides.

A encapsulação do hidrolisado do soro do leite caprino foi realizada com êxito empregando alginato de sódio e um revestimento de proteínas concentradas do soro do leite demonstrando a ampla variedade de alternativas para o uso deste subproduto. As cápsulas não foram rompidas com a liofilização e a adição do revestimento na resultou na formação de uma camada protetora que diminuiu as deformidades na superfície do material encapsulado. Esse processo foi efetivo para resguardar o potencial funcional do hidrolisado do soro do leite caprino frente à digestão gastrointestinal obtendo-se frações bioacessíveis que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos produtos com potencial benefício a saúde.

Dessa forma os resultados obtidos podem prospectar a utilização dos hidrolisados do soro do leite como um ingrediente alimentar ou como nutracêutico fomentando o reaproveitando um subproduto para geração de renda e comercialização. Os resultados são promissores na área de encapsulação de bioativos sugerindo que encapsular frações proteicas hidrolisadas é uma alternativa eficaz como uma estratégia de preservação destes. Novos estudos devem ser sistematizados no intuito elucidar outras perspectivas de cápsulas contendo hidrolisados proteicos, avaliando parâmetros como a estabilidade vide de prateleira e a inserção destas em uma matriz alimentar.

ANEXOS

Seguem os comprovantes emitidos pelas revistas após a submissão dos artigos.

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

Confirm co-authorship of submission to International Journal of Biological Macromolecules

1 mensagem

International Journal of Biological Macromolecules <em@editorialmanager.com> 22 de março de 2023 às 21:17
Responder a: International Journal of Biological Macromolecules <support@elsevier.com>
Para: Maria Campos <belcampos.va@gmail.com>

This is an automated message.

Journal: International Journal of Biological Macromolecules
Title: Bio-potential goat whey peptides, rsm optimization, characteristics evaluation and in silico, in vitro and in vivo trials using a Zebrafish (Danio rerio) model
Corresponding Author: Dr Tatiane Santi
Co-Authors: Maria Campos; Ana Lima; José Lopes Neto; Julia Caju; Antonio Silva; Maria Ferreira; Jackson Miyamoto; Carlos Gadelha; Helcio santos; Emmanuel Marinho; Alexandre Tashima
Manuscript Number: IJBIOMAC-D-23-03268

Dear Maria Campos,

The corresponding author Dr Tatiane Santi has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for International Journal of Biological Macromolecules.

Submission Title: Bio-potential goat whey peptides, rsm optimization, characteristics evaluation and in silico, in vitro and in vivo trials using a Zebrafish (Danio rerio) model

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: Yes, I am affiliated.

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright ; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement , effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at santi.tatiane@gmail.com.

Thank you,
International Journal of Biological Macromolecules

More information and support
FAQ: What is copyright co-author verification?

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

Confirm co-authorship of submission to Food Hydrocolloids - [EMID:9722c4ad01526856]

1 mensagem

Food Hydrocolloids <em@editorialmanager.com> 22 de março de 2023 às 19:57
Responder a: Food Hydrocolloids <support@elsevier.com>
Para: Maria Campos <belcampos.va@gmail.com>

This is an automated message.

Journal: Food Hydrocolloids
Title: Development, characterization and encapsulation of goat whey protein hydrolysates by freeze-drying, impact on stability, digestibility and bioaccessibility
Corresponding Author: Dr Tatiane Santi
Co-Authors: Maria Campos; Ana Lima; José Lopes Neto; Kerolayne Leite; Julia Oliveira; Fábio Cardoso; Marcos Fontes; Cristiani Grisi; Carlos Gadelha
Manuscript Number: FOODHYD-D-23-00852

Dear MSC Maria Campos,

The corresponding author Dr Tatiane Santi has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Food Hydrocolloids.

Submission Title: Development, characterization and encapsulation of goat whey protein hydrolysates by freeze-drying, impact on stability, digestibility and bioaccessibility

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: Yes, I am affiliated.

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright ; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement , effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at santi.tatiane@gmail.com.

Thank you,
Food Hydrocolloids

More information and support
FAQ: What is copyright co-author verification?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/