

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
ÁREA DE BIOTECNOLOGIA

ROBERTO AFONSO DA SILVA

Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil.

Recife,
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
ÁREA DE BIOTECNOLOGIA

ROBERTO AFONSO DA SILVA

Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – Área de Concentração em Biotecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Co-Orientadora: Maria Taciana Cavalcante Vieira Soares

Recife,
2012

Em memória da minha amada mãe ANA
LÚCIA DA SILVA, pelo AMOR
incondicional dedicado a minha vida. E ao
meu filho Roberto Levi Caieiro Afonso.

Dedico

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS.

A meus pais por toda a dedicação e educação que me passaram até hoje, pois sem o grande apoio deles seria mais difícil ainda superar esta nova etapa da vida e chegar até este momento.

A meus avós, minha irmã e aos meus tios.

A toda minha família pelo apoio que vem me dando.

A minha namorada Ely Chaves pelo incentivo e entendimento.

Ao meu orientador em especial Prof. José Luiz de Lima Filho, pela oportunidade, confiança, orientação e principalmente pela amizade e conversas nos momentos oportunos.

A minha Co-orientadora Profa. Maria Taciana, pela amizade e as imprescindíveis orientações prestadas.

A minha primeira mãe científica a Profa. Carminha quem vem me acompanhando e ajudando desde a época de Iniciação Científica e que sua colaboração foi fundamental para a finalização deste trabalho.

A Profa. Ana Porto pela colaboração e suporte aos experimentos.

Aos amigos especialmente Vilma, Meire e Juliana por toda contribuição aos experimentos realizados.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE, e todos os amigos de turma do Doutorado.

Aos dirigentes do LIKA, seus funcionários e sua comunidade como um todo.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Biotecnologia em especial.

A FACEPE e a CAPES pelo apoio financeiro.

Em fim a todos que contribuíram direta e indiretamente, que pela mínima ajuda que deram, contribuíram para minha chegada até aqui.

Muito obrigado

Mãe não deveria morrer*

Por que será que Deus permite
Que um dia a mãe vá se embora
Tempo de mãe não tem limite
Pois deixa um filho que chora

Eu acho que neste nosso mundo
A mãe não poderia jamais morrer
Pois deixa um desgosto profundo
Aos filhos que veio a conceber

Deveria se decretar uma lei nova
Que a vida da mãe fosse à prova
De morte ou de desaparecimento

Porque a mãe é para toda vida
Pelos filhos, a joia pretendida
Que não deveria ter vencimento.

* "Soneto inspirado no poema Para Sempre de Carlos Drummond de Andrade"

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Introdução	1
Referências Bibliográficas	9
Objetivos	12
Revisão de Literatura (Artigo de Revisão)	14
Capítulo I: Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de Coalho artesanal produzido na Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil.	53
Capítulo II: Avaliação da contagem de células somáticas e da qualidade físico-química do leite e do queijo de Coalho artesanal produzido na região agreste de Pernambuco – Brasil.	72
Capítulo III: Proteolysis Characterization in Artisanal “Coalho” Cheese from Semi-Arid (Agreste) of Pernambuco State-Brazil: by using SDS-PAGE and MALDI-ToF.	90
Capítulo IV: Can Artisanal “Coalho” Cheese From Brazilian Northeastern Be Used as Functional Food?	133
Considerações Finais	162

Anexo I: Relatórios de Visita Técnica **164**

Anexo II: Relatórios de Visita Técnica **186**

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos em (PCR) reação em cadeia da polimerase. (A) *primer* gênero específico para Lactobacilos. (B) *primer* espécie-específico para *Enterococcus faecalis*. (C) *primer* espécie-específico para *Enterococcus faecium*. (D) *primer* gênero específico para Enterococos. (E) *primer* espécie-específico para *Streptococcus thermophilus* e (F) *primer* espécie-específico para *Lactococcus lactis*. Os Poços (1-6) março/2008: Cachoeirinha, Arcoverde, São Bento do Una, Capoeiras, Correntes e Venturosa. Os Poços (7-12) amostras de julho/2008: Cachoeirinha, Arcoverde, São Bento do Una, Capoeiras, Correntes e Venturosa.

Capítulo II

Figura 1. Fluxograma de produção do queijo de Coalho produzido pelos Municípios estudados da Região Agreste do Estado de Pernambuco.

Capítulo III

Figure 1. Production flowchart of artisanal “Coalho” cheese from semi-arid (Agreste) region of Pernambuco State-Brazil.

Figure 2. SDS-PAGE (15%) of proteins from artisanal “Coalho” cheeses. Lines: molecular weight markers (A) and cities: Arcoverde (B); Cachoeirinha (C); Capoeiras (D); Correntes (E); São Bento do Una (F); Venturosa (G).

Figure 3. MALDI-ToF mass spectra of water-soluble peptides from artisanal “Coalho” cheeses. Only peptides with $m/z < 3500$ were monitored. The cities: Arcoverde (A) and Cachoeirinha (B).

Figure 4. MALDI-ToF mass spectra of water-soluble peptides from artisanal “Coalho” cheeses. Only peptides with $m/z < 3500$ were monitored. The cities: São Bento do Una (C) and Venturosa (D). **130**

Figure 5. MALDI-ToF mass spectra of water-soluble peptides from artisanal “Coalho” cheeses. Only peptides with $m/z < 3500$ were monitored. The cities: Venturosa (E) and Correntes (F). **131**

Capítulo IV

Figure 1. Production flowchart of Artisanal “Coalho” cheese from Agreste region of Pernambuco State - Brazil. **156**

Figure 2. Amount of peptides formed during the manufacture of Artisanal “Coalho” cheese by mass spectrometry analyses (MALDI-ToF). Peptide molecular weight range from 800 to 3500 Da. Producer Towns of cheeses: Arcoverde (ARC); Cachoeirinha (CAC); Capoeiras (CAP); Correntes (COR); São Bento do Una (SBU) and Venturosa (VEN). **157**

Figure 3. Effect of the time on antioxidant activity of water soluble peptides extracts from Artisanal “Coalho” cheeses. Peptide concentration: 17 mg/ml. Standard deviations were $\pm 2.0 \%$ (based on three replicates). **158**

Figure 4. Effect of concentration of water soluble peptides extracts from Artisanal “Coalho” cheeses, on activity antioxidant in 90 min. Standard deviations were $\pm 3.0 \%$ (based on three replicates). **159**

Figure 5. Zinc-binding activity of water soluble peptides extracts from Artisanal “Coalho” cheeses. Standard deviations were $\pm 0.65 \%$ (based on three replicates). **160**

Lista de Tabelas

Artigo de Revisão:

Tabela 1: Principais sequências de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade anti-hipertensiva **36**

Tabela 2: Principais sequências de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade antimicrobiana **37**

Tabela 3: Principais sequências de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade opióide **38**

Tabela 4: Principais sequências de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade antioxidante **39**

Capítulo I

Tabela 1. *Primers* espécie-específicos usados para caracterizar o perfil bacteriano ácido-lático dos queijos de Coalho produzido nos municípios estudados na Região Agreste do Estado de Pernambuco. **69**

Tabela 2. Análises microbiológicas dos queijos de Coalho artesanais provenientes dos municípios estudados na Região Agreste do Estado de Pernambuco. **70**

Capítulo II

Tabela 1. Análises físico-químicas e contagem de células somáticas do leite utilizado como matéria-prima para fabricação dos queijos de Coalho artesanais provenientes dos municípios estudados na Região Agreste de Pernambuco. **88**

Tabela 2. Análises físico-químicas dos queijos de Coalho provenientes dos municípios estudados na Região Agreste de Pernambuco. **89**

Capítulo III

Table 1. Molecular weight (MW) species identified in the artisanal “Coalho” cheese samples using mass spectrometry (MALDI-ToF). Species whose MW are typed in bold were confirmed as peptides. **123**

Table 2. List of peptides detected using MALDI-ToF mass spectra in artisanal “Coalho” cheese from α -Casein proteolysis. **124**

Table 3. List of peptides detected using MALDI-ToF mass spectra in artisanal “Coalho” cheese from β -casein proteolysis. **125**

Table 4. List of peptides detected using MALDI-ToF mass spectra in artisanal “Coalho” cheese from κ -Casein proteolysis. **126**

Capítulo IV

Table 1 Antimicrobial activity of water soluble peptide extracts from Artisanal “Coalho” cheese. **161**

Resumo

O queijo de Coalho Artesanal é um produto tipicamente Nordestino e muito popular, amplamente consumido pela população local, sendo sua produção uma importante atividade no âmbito socioeconômico da Região. O objetivo deste trabalho foi estudar as características microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanais produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil. Os leites utilizados como matéria prima e os queijos foram obtidos em queijarias localizadas em 6 municípios da Região Agreste: Arcoverde, Cachoeirinha, Capoeiras, Correntes, São Bento do Una e Venturosa. As amostras de leite foram analisadas quanto à contagem de células somáticas (CCS) por citometria de fluxo no Somacount300®, e quanto aos parâmetros físico-químicos (sólidos totais, proteínas totais, gordura total e Lactose) por leitura de absorção infravermelha no equipamento Bentley2000®. Os queijos foram avaliados em relação aos parâmetros físico-químicos (proteínas, lipídeos, umidade e Lactose) de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006 – MAPA e microbiológicos: coliformes totais [AOAC/2002 (991.14)] e coliformes termotolerantes [AOAC/2002 (986.33)]. A microbiana láctica foi analisada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* espécies-específicos para o gênero *Lactobacilos* e as espécies: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Os perfis proteicos dos extratos aquosos dos queijos foram analisados utilizando eletroforese SDS-PAGE e os peptídicos usando espectrometria de massa (MALDI-ToF). Os peptídeos solúveis em água (WSP) dos queijos foram testados quanto às atividades: antioxidante (método do ABTS), carreadora de zinco (método AOAC, 2000) e antimicrobiana (método NCCLS, 2003). Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos e CCS dos leites estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, apresentando os seguintes valores: proteínas (2,99 - 3,48%); gorduras (3,24 - 4,0%); extrato seco total (EST) (10,79 - 12,49%); lactose (4,26 - 4,61%) e CCS ($9,2 \times 10^4$ - $5,28 \times 10^5$ células/mL). Os queijos também apresentaram parâmetros físico-químicos e microbiológicos dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, tais como: umidade (52,76 - 58,37%); proteína (17,04 - 21,59%); lipídeos (21,25- 27%) e lactose (3,54 - 5,01%). Foi observado também que o queijo de coalho pode ser classificado como de alta a muito alta umidade e magro a semi-gordo. Todas as amostras de queijo analisadas apresentaram coliformes totais e termotolerantes dentro dos padrões de qualidade sanitária exigida para consumo humano. Os perfis das microbianas ácido-láticas dos queijos avaliados foram heterogêneos, constituídos por todos os gêneros testados (*Lactobacilos*, *Lactococos*, *estreptococos* e *enterococos*) e pelas espécies (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*). Em relação ao perfil proteico, foi possível detectar a presença de lactoferrina, β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, soroalbumina, α -caseína, β -caseína, κ -caseína e para- κ -caseína, além de 12 proteínas que migraram diferente dos padrões utilizados. Quanto aos perfis peptídicos dos extratos, observou-se elevado grau de proteólise originando uma média de 66 peptídeos dentre os quais 32 identificados na literatura como produtos da hidrólise das caseínas (11 α_{S1} -Casein, 3 α_{S2} -Casein, 15 β -caseína e 3 κ -caseína) e 7 caseinofosfopeptídeos. Dentre os peptídeos não identificados, três apresentaram picos de alta intensidade com pesos moleculares de 1597, 1725/1726,37 2778/2779 Da, sugerindo que estes podem ser um possível marcador molecular para os queijos de coalho do agreste de Pernambuco. Os extratos aquosos dos queijos de Coalho apresentaram as seguintes bioatividades: antioxidante ($91,1 \pm 0,43$ - $75,92 \pm 0,7\%$ de inibição); carreadora de zinco ($75,47 \pm 0,5$ - $61,67 \pm 0,65$ % de carregamento) e

antimicrobiana para as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Enfim, este trabalho mostra o grande potencial biotecnológico que confere alto valor agregado ao queijo de coalho regional contribuindo para o desenvolvimento do setor produtivo do Estado de Pernambuco.

Palavras-chave: Queijo de coalho artesanal, peptídeos bioativos, MALDI-ToF, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Abstract

The Artisanal “Coalho” cheese is a product typically northeastern and very popular, widely consumed by local population, representing an important socioeconomic activity for this region. The aim of this study was to obtain the microbiological, physico-chemical, proteomics and bioactive characterizations of the Artisanal “Coalho” cheeses produced in the Agreste region of Pernambuco State - Brazil. The milks used as raw material in the manufacture of cheese and the cheeses were obtained from factories located in six Towns: Arcoverde, Cachoeirinha, Capoeiras, Correntes, São Bento do Una and Venturosa. The milk samples were analyzed for somatic cell counts (CCS) by flow cytometry in Somacount300®, physico-chemical parameters (total solids, total protein, total fat and lactose) by absorbance from infrared absorption equipment Bentley2000®. The cheeses were evaluated about physico-chemical parameters (proteins, lipids, moisture and lactose) according to Instruction nº68 of 12/12/2006 - MAPA, microbiological testing for the presence of total [AOAC/2002 (991.14)] and thermotolerants [AOAC/2002 (986.33)] coliforms. Lactic microbiota was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primers in spite of *Lactobacillus* genus, and the following: species *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. The profiles of proteins of the aqueous extracts from cheeses were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and peptides by mass spectrometry (MALDI-ToF). Water-soluble peptides (WSP) from “Coalho” cheeses were tested for following activities: antioxidant (ABTS method); zinc-binding (AOAC method, 2000) and antimicrobial (NCCLS method, 2003). The results obtained for the physico-chemical and CCS parameters of milks used as raw material were within the limits established by Brazilian law, showing these results: proteins (2.99 – 3.48%); fats (3.24 – 4.0%); total dried extract (10.79 – 12.49%); lactose (4.26 – 4.61%) and CCS (9.2×10^4 – 5.28×10^5 cells/mL). The cheeses also had values for the physico-chemical and microbiological parameters within the standards established by law, such as: moisture (52.76 – 58.37%); proteins (17.04 – 21.59%); fats (21.25- 27%) and lactose (3.54 – 5.01%). It was observed that the “coalho” cheeses can be classified as high to very high moisture and non-fat to semi-fat cheese. All the cheese samples had total and thermotolerant coliforms according to the sanitarian standards of quality necessary for human consumers. The profile of lactic microbiota of cheeses evaluated showed heterogeneous comprising all genus (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) and e species (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*) tested. In spite of the proteic profile using aqueous extracts, it was possible to detect the presence of lactoferrin, β -lactoglobulin, α -lactoglobulin, serum albumin, α -casein, β -casein, κ -casein and para- κ -casein and more 12 different proteins compared to the protein standard. The peptide profiles of the WSP samples showed high degree of proteolysis resulting in an average of 66 peptides containing 32 known peptides by literature obtained as product from casein hydrolysis (11 α_{S1} -Casein, 3 α_{S2} -Casein, 15 β -casein and 3 κ -casein) and 7 caseinphosphopeptides. Among non-identified peptides, three of them showed peak at high intensity in all “Coalho” cheeses studied, with a molecular weight of 1597, 1725/1726, 2778/2779 Da, suggesting that these peptides may be a possible molecular marker for the “Coalho” cheese of Agreste Pernambuco State-Brazil. Regarding to bioactivities using WSP samples, the results showed the following activities: antioxidant (91.1 ± 0.43 - $75.92 \pm 0.7\%$ inhibition); zinc-binding (75.47 ± 0.5 - $61.67 \pm 0.65\%$ of bind) and antimicrobial for bacteria *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Finally, this work showed the great

biotechnological potential of this cheese that lead to the high aggregation value for regional “Coalho” cheeses collaborating to socioeconomic development of the productive sector in the Pernambuco State.

Keywords: Artisanal “Coalho” cheese, bioactive peptides, MALDI-ToF, antioxidant activity, antimicrobial activity, zinc-binding.

1-INTRODUÇÃO



1.1. Leite

O leite é uma secreção fluida das fêmeas de todas as espécies de mamíferos. Por ser considerada uma mistura complexa de espécies bioativas, fornece os nutrientes essenciais para os neonatos, exercendo uma série de funções fisiológicas por meio de suas proteínas e peptídeos (MEISEL, 1997). A caseína ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β e κ) é uma das proteínas mais importantes presentes no leite, correspondendo a aproximadamente 80% do total proteico (KORHONEN et al., 1998). Muitas substâncias biologicamente ativas estão presentes no leite, algumas dessas são completamente ativas dentro de proteínas, tais como as caseínas, enquanto outras estão latentes até que suas frações peptídicas ativas sejam liberadas no processo de proteólise (LEPPALA-PIHLANTO, 2001). As atividades biológicas no leite incluem funções moduladoras das funções digestivas e intestinais, hormônios e fatores do crescimento capazes de influenciar no desenvolvimento gastrointestinal, além de imunoregulação e modulação da microflora intestinal e agentes antibacterianos (SMACCHI & GOBERTTI, 2000). A bioatividade das proteínas do leite pode ser induzida por proteólise microbiana, como por exemplo a β -casomorfina imunoreativa encontrada no leite de vaca originada a partir de várias espécies bacterianas incluindo as bactérias ácido-láticas.

1.1.1. Bacia Leiteira de Pernambuco e Nordeste Brasileiro

A bacia leiteira nordestina é o mercado com maior potencial de crescimento industrial do País, cujo crescimento anual está acima de 10% nas últimas décadas. De acordo com a Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária de Pernambuco, a produção estadual de leite cresceu cerca de 23% nos últimos dois anos. A maior bacia leiteira está localizada no Agreste, com representatividade de 73% do total. Segundo o IBGE (2009), a produção anual do Estado ultrapassou os 788 milhões de litros em 2009 ou 21% da produção nordestina e 2,7% do leite brasileiro, colocando Pernambuco como o segundo colocado no Nordeste, atrás apenas da Bahia, e 8º maior produtor no âmbito nacional. São cerca de 14 mil pequenos e médios produtores de leite atuando no mercado estadual, onde a maioria não ultrapassa os 300 litros/dia. O rebanho bovino tem crescido nos últimos dez anos em uma média de 4,4% ao ano. O Estado possuía, em 1999, um plantel de 1.420.449 animais contra 1.909.468 em 2005, segundo o IBGE, e hoje já ultrapassou os 2 milhões. A produção diária de leite em Pernambuco ultrapassa a 1,5 milhão de litros, dessa produção, cerca de um terço vai para queijos regionais, como queijo coalho e queijo manteiga, 200 mil a 300 mil litros de leite cru

resfriado são embarcados para Estados vizinhos e o restante vai para as indústrias formais, que totalizam quatro com registro de inspeção federal e em torno de 50 com registro de inspeção estadual.

Além do clima satisfatório, o consumo de leite tem crescido e a profissionalização da produção também, reflexo da exigência da indústria. A atividade está em expansão no Estado. Há algum tempo, o governo promoveu um programa de leite que está consolidado junto ao Fome Zero e capta 80 mil litros de leite por dia. Pela necessidade da formalização, começa a se ter uma gestão das empresas e das fazendas, e começam a aparecer números maiores. A produção, no ano 2000, era em torno de 600 mil litros de leite por dia. Embora todo ano a atividade venha crescendo acima da média nacional, cerca de 20% ao ano. O Estado de Pernambuco detém a maior rede de fábricas de queijo de coalho do Nordeste, embora muitos sejam artesanais. Para reverter esse quadro, o governo está incentivando a regulamentação dessas fábricas. Inclusive, tramita na Assembleia Legislativa um projeto estabelecendo as exigências de acordo com a capacidade de produção.

A partir de 2009 a cadeia produtiva do leite em Pernambuco começou a ser mapeada, através de um convênio entre o Serviço Nacional de Aprendizagem do Cooperativismo em Pernambuco (Sescoop/PE) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). O resultado do diagnóstico vai contribuir para a definição de políticas públicas para o setor e para nortear as estratégias da iniciativa privada. O diagnóstico será realizado no momento em que a bacia leiteira do Estado de Pernambuco vive um momento de efervescência, com a instalação de novos laticínios (Perdigão-Batavo, Cemil e Betânia) e com a compra da Parmalat pela Gaúcha Bom Gosto.

A região encontra-se em bastante crescimento, já em 2010 foi inaugurado o Centro Tecnológico - Instituto de Laticínios do Agreste - CT Laticínios que está localizado em Garanhuns, e oferece cursos de qualificação voltados para pequenos produtores e queijarias.

Para fortalecer mais ainda o setor leiteiro do Estado foi realizada a inauguração do laticínio da Cooperativa dos Produtores de Leite de Surubim (COOPLESUR), a unidade tem capacidade inicial de 10 mil litros/dia, podendo chegar a 30 mil litros diários. O objetivo é resgatar a Bacia Leiteira do Agreste Setentrional, que abrange seis municípios, beneficiando cerca de 100 pequenos produtores da Região. A fim de dar impulso para o crescimento do laticínio, a Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária vai assegurar a aquisição de 2304 litros de leite diários para o Programa Leite de Todos, custeado pelo Programa Fome Zero, do Governo Federal, e mais mil litros para a Merenda Escolar, do Governo do Estado.

Por último o governador Eduardo Campos e o prefeito de Caruaru, assinaram em 06/09/2011 a ordem de serviço de R\$ 47 milhões para as obras de implantação da Cooperativa Central Mineira de Laticínios, a Cemil. A unidade industrial será construída ao lado do Centro de Abastecimento de Caruaru (Ceaca) na BR 104. A empresa mineira que irá produzir leite longa vida e derivados, deve gerar 250 empregos diretos e ainda trabalhar em regime de cooperativa com os pequenos produtores da bacia leiteira, através da Cooperativa do Agronegócio do Leite (Cooleite). A estimativa é de que no primeiro ano a empresa produza em média 100 mil litros de leite e laticínios por dia e tenha um faturamento de R\$ 70 milhões.

1.2. Queijo de Coalho

A fabricação de queijos data dos tempos mais remotos. Na Bíblia, são feitas alusões sobre o uso dos derivados do leite, no ano de 1050 a.C, quando o rei Davi já se referia a sua fabricação (SOUZA, 1960). Na América do Sul, a primeira indústria de queijos foi construída, no Brasil, em Minas Gerais, na Serra da Mantiqueira em 1888 (NOVAIS, 1988).

O queijo de Coalho é um dos mais tradicionais e produzido há mais de 150 anos a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado (CAVALCANTE, 2007). Devido à simplicidade de sua tecnologia é amplamente fabricado e consumido em vários Estados da Região Nordeste do Brasil. Trata-se de um produto popular e que faz parte da cultura da Região, bastante consumido principalmente nos estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco; porém hoje em dia pode ser encontrado sendo fabricado e consumido em outras regiões do país (AQUINO, 1983). Dependendo do Estado produtor o fluxograma de produção difere, como por ex. em Pernambuco é produzido com massa crua e tradicionalmente consumido fresco, no Ceará e Rio Grande do Norte é fabricado com massa semi-cozida e consumido fresco ou maturado. Antigamente utilizava-se para coagulação do leite o coalho do estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros. Atualmente esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial (GONDIM, 1998).

Segundo a cultura local, este alimento surgiu quando as pessoas utilizavam recipientes feitos com estômago de animais para transportar leite. Depois de certo tempo em contato com o interior do utensílio, o leite transformava-se em uma massa coagulada, tendo sido submetido à ação das enzimas digestivas, como a quimosina. Assim, quando as pessoas abriam o recipiente não encontravam o leite fluido, mas um coágulo. Com o decorrer do tempo, os homens passaram a apreciar o produto coagulado e a produção do queijo de coalho começou a ser disseminada. Inicialmente, pedaços de estômago de pequenos animais, como

moco, preá, cabritos, cordeiros e bezerros eram colocados dentro de um utensílio contendo leite cru (AQUINO, 1983). Depois de certo tempo, o leite coagulava-se, então era feito o corte do coágulo, a mexedura da massa, a dessoragem e a enformagem, seguida de salga. Este costume sempre foi passado de geração para geração tornando-se, então, uma das principais características da cultura nordestina.

Infelizmente, há escassez com relação à disponibilidade de dados estatísticos sobre a produção de queijo de coalho nos estados e no país como um todo. Porém, certamente a produção artesanal de queijo de coalho é bastante expressiva para o contexto da economia regional de vários estados nordestinos. Cerca de 30% do leite produzido em Pernambuco é destinado para esta finalidade, atingindo 40 a 50% em algumas microrregiões (ESCOBAR, 2001).

A maioria dos queijos de Coalho é fabricada em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais (ESCOBAR, 2001). Sabe-se que na elaboração de queijos, os fermentos ou culturas lácticas desempenham papel importante, porque a acidez produzida facilita a ação do coalho e auxilia na expulsão do soro (FERREIRA, 2001). As propriedades organolépticas típicas e aroma particular dos queijos obtidos com leite cru estão associados com atributos do próprio leite, relacionado à raça e ao tipo de nutrição das vacas; o processo de fabricação básico do queijo tradicional e a microbiota natural (responsáveis pela fermentação e maturação) (BERESFORD et al., 2001).

Em diversos trabalhos científicos é relatado que a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento e o processo de maturação dos queijos são imprescindíveis para a obtenção de produtos de qualidade e para a proteção da saúde do consumidor (FOX, 1993; FURTADO, 1990; FURTADO, 1991; FURTADO, 2005).

1.2.1. Critérios Oficiais de identidade e qualidade de queijo de coalho

Tecnicamente, o queijo de coalho pode ser definido como o produto obtido por coagulação enzimática, cuja coalhada pode ou não sofrer aquecimento, sendo prensado manualmente ou em pequenas prensas e salgado a seco, diretamente na massa ou na superfície (MANGUEIRA, 2001). O queijo de coalho produzido em estabelecimentos artesanais em Pernambuco pode ser definido pela legislação sobre Inspeção e Fiscalização Agropecuária deste estado em dois tipos: Tipo A: queijo elaborado com leite integral ou desnatado pasteurizado, massa crua prensada, suficientemente dessorada, salgada e maturada; Tipo B:

queijo elaborado com leite cru integral ou desnatado, não pasteurizado, massa crua, prensada ou não, suficientemente dessorada, salgada e maturada. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (BRASIL, 2001) define este produto como o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É classificado como queijo de médio a alto teor de umidade, de massa cozida ou semicozida, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais entre 35 e 60%. Quanto aos aspectos sensoriais, apresenta consistência semidura e elástica com textura compacta e macia. As principais características distintivas do processo de elaboração são: coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45 °C) ou cozida (entre 45 e 55 °C), adição de sal (cloreto de sódio) a massa, prensagem, secagem, embalagem e estocagem a 10-12 °C. Este queijo, também poderá ser elaborado a partir de massa crua, ou seja, sem aquecimento.

Quanto aos requisitos físico-químicos do queijo de coalho, correspondem as características de composição e qualidade dos queijos de média a alta umidade, conforme estabelecido pelo MAPA, no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996) e com teor de gordura nos sólidos totais (GST) entre 35% e 60%. E quanto aos critérios microbiológicos o queijo de coalho deverá obedecer aos critérios estabelecidos para queijo de médio a alto teor de umidade no Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos – Portaria no 146/96 – MAPA (BRASIL, 1996).

1.3. Peptídeos Bioativos

Os peptídeos produzidos *in vivo* ou *in vitro* por hidrólise enzimática de proteínas dos alimentos com função biológica ou efeitos fisiológicos são chamados de peptídeos bioativos. Derivados a partir de proteínas de origem bacteriana, vegetal e animal, eles possuem propriedades opióides, antitrombóticas, antihipertensivas, imunomoduladoras, antibacterianas, anti-gástricas, carreadora de minerais e diminuição do colesterol (SILVA & MALCATA, 2005; MEISEL, 1998).

Os produtos lácticos podem conter peptídeos bioativos, embora tratamentos químicos e físicos possam ter influência, a proteólise por enzimas de ocorrência natural no leite por enzimas exógenas e por enzimas a partir de culturas iniciadoras tais como as bactérias ácido-lácticas (BAL) são principalmente responsáveis pela geração de peptídeos bioativos durante o processamento dos laticínios promovendo o seu enriquecimento (SMACCHI & GOBBETTI, 2000).

Os peptídeos liberados a partir de proteínas dos alimentos durante a fermentação têm ganhado interesse especial porque eles podem também influenciar numerosas respostas fisiológicas no organismo (SMACCHI & GOBBETTI, 2000), tais como os peptídeos funcionais derivados das caseínas, presente no leite e produtos lácteos, que tem mostrado efeitos no sistema cardiovascular, principalmente: anti-trombótico e anti-hipertensivo (SILVA & MALCATA, 2005); dois tri-peptídeos derivados da caseína com potente atividade inibidora da ECA (enzima conversora de angiotensina) e efeito anti-hipertensivo *in vivo* que foram isolados a partir de leites fermentados com *Lactobacillus helveticus* e *Sacharomyces cerevisiae* (YAMAMOTO & TAKANO, 1999); caseinofosfopeptídeos formados durante a maturação dos queijos devido à atividade da plasmina e proteases bacterianas (ADDEO et al., 1992); peptídeos com atividade imunomoduladora obtidos a partir das β -caseínas (β -CN) através da fermentação com bactérias ácido-lácticas (LAFFINEUR et al., 1996). Esses peptídeos biologicamente ativos, são sugeridos como ajudantes na manutenção da boa saúde, podem assim ser ingeridos como componentes que ocorrem naturalmente nos alimentos (GÓMEZ – RUIZ et al., 2002).

Apesar de sua complexidade, diferentes tipos de queijos têm sido usados como fonte de peptídeos anti-hipertensivos (SAITO et al., 2000; RYHANEM et al., 2001). Nesses casos, a identificação e análise estrutural dos peptídeos foram encontradas pela combinação de diferentes técnicas analíticas, por exemplo, sequenciamento de proteína, composição dos aminoácidos e espectrometria de massa (MS). Esses achados têm levado a sugerir que produtos contendo peptídeos inibitórios da enzima conversora de angiotensina (ECA) podem ter um grande potencial como alimento funcional para prevenir a hipertensão (GÓMEZ-RUIZ et al., 2002).

Os Diversos peptídeos bioativos encontrados nos queijos pode ser devido à intensa proteólise durante a maturação. As condições de maturação e o tipo de cultura iniciadora utilizada afetam a síntese de peptídeos. Já foi relatada a presença de peptídeos inibidores de ECA tais como: peptídeo anti-hipertensivo derivado de alfa-S1-caseína isolado a partir de queijo Parmesão maturado por 6 meses (ADDEO et al., 1992); peptídeos inibidores da ECA

isolados a partir de diversos queijos italianos caracterizados por períodos de maturação curtos, como por exemplo, o Crescenza e Itálico e médio, como o Gorgonzola (SMACCHI & GOBBETTI, 2000); caseinofosfopeptídeos obtidos durante a maturação de queijos cozidos como o Comté (ROUDO-ALGARON et al., 1994) ou o Grana Padano (PELLEGRINO et al., 1997). As enzimas proteolíticas originadas a partir das bactérias ácido-lácticas produzem peptídeos bioativos em diversos produtos lácticos, e uma vez liberados, esses peptídeos influenciam atividades bioquímicas da comunidade microbiana. Este papel tem provavelmente sido subestimado no processamento dos laticínios (SMACCHI & GOBBETTI, 2000).

Peptídeos bioativos ou sequências relacionadas produzidas por enzimas exógenas ou de bactérias ácido lácticas seletivamente inibem proteólise microbiana durante a maturação. Esses peptídeos com atividade inibitória nas peptidases intracelulares de bactérias ácido-lácticas têm sido isolados a partir de queijos tipo Cheddar e Jarlsberg, e a partir de diversos queijos italianos produzidos usando diferentes metodologias: Parmesão, Pecorino Romano, Crescenza, Mozzarella (GOBBETTI et al., 1995).

Se não forem liberados sob condições fisiológicas *in vivo*, peptídeos bioativos podem ser produzidos comercialmente e usados como nutracêuticos, como por exemplo, nos alimentos ou como parte de um alimento que fornece benefícios médicos para manutenção da saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças (DE FELICE, 1995). Diversos alimentos fermentados funcionais derivam sua atividade a partir da liberação de peptídeos bioativos que estão escondidos dentro de sequências de aminoácidos presentes nas proteínas dos alimentos e liberados após a digestão enzimática (STANTON et al., 2005). Algumas bactérias “*food grade*”, em particular *Lactobacillus helveticus*, têm sido usadas para gerar peptídeos bioativos que exibem atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas e imunomoduladoras durante a fermentação do leite (SEPPO et al., 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDEO, F.; CHIANESE, L.; SALZAANO, A.; SACCHI, R.; CAPPUCCINO, U.; FERRANTI, P.; MALORNI, A. Characterization of the 12% trichoroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmegiano-Reggiano Cheese. **Journal of Dairy Research** 1992; v. 59, n. 3, p. 401-411.
- AQUINO, F. T. M. Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal da Paraíba 1983, 74p.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal** 2001; v. 11, p. 259-274.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga de terra ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº30, de 26/06/ 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul.2001, p.13-15.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria n.146, de 07 mar.1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11mar. 1996, p. 3977-3978.
- CAVALCANTE, J. F.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 2007; Campinas, v. 27, n. 1, p. 205-214
- DE FELICE, S. L. The nutritional revolution: its impact n food industry R & D. **Trends Food Science Technology** 1995, v. 6, p. 59-61.
- ESCOBAR, C. A. M. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora** 2001, v. 56, n. 321, p. 248-256.
- FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos fermentados - Aspectos bioquímicos e tecnológicos, 2º. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, (**Cadernos Didáticos, 43**). 112 p., 2001.
- FOX, P. F. Cheese: Chemistry, physics and microbiology, 2º. ed. London: **Chapman & Hall**, v. 1, 577 p., 1993.
- FURTADO, M. M. A qualidade do leite. In: **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Editora Globo, p. 21-33, 1991.
- FURTADO, M. M. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e de soro de queijo da Região do Serro, Minas Gerais. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 95p. 1990.
- FURTADO, M. M. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção, 2º. ed. São Paulo: **Fonte Comunicações e Editora**, 200p., 2005.
- GOBBETTI, M.; STEPANIAK, L.; FOX, P. F.; SORHAUG, T.; TOBIASSEN, R. Inhibition of endo- and amino-peptidase activities in cytoplasmic fractions of Lactococcus, Lactobacillus and Propionibacterium by peptides from different cheeses. **Milchwissenschaft** 1995, v. 50, p. 565-570.
- GONDIM, F. A. L. Renforcement des propriétés organoleptiques d'un fromage à pâte pressée brésilien COALHO DO CEARA à l'aide de la lipase-estérase de Rhizomucor miehei. 1995. **Thèse (Doctorat)**, L'Institut National Polytechnique de Lorraine, Lorraine, 118p., 1995.
- GOMES-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin –converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal** 2002; v. 12, n. 8, p. 697-706.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal** 2009. Rio de Janeiro, v. 37, p. 1-52.
- KORHONEN, H.; LEPPALA-PIHLANTO A.; RANTAMAKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in food e technology** 1998; v. 9, p. 307-319.
- LAFFINEUR, E.; GENETE, N.; LEONIL, J. Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science** 1996, v. 79, p. 2112-2120.
- LEPPALA-PIHLANTO, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and aceinhibitory peptides. **Trends in food science e technology** 2001, v. 11, p.347-356.
- LIMA, M. H. P. Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. 82 f.. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)**, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 82p., 1996.
- MANGUEIRA, T. F. B. Aceitação sensorial de queijo de coalho com baixo teor de gordura (light) e enriquecido com ferro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 109–116, 2001.
- MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal** 1998; v. 8, n. 5/6, p.363-373.
- MEISEL, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. **Livestock productions science** 1997; v. 50, n. 1, p. 125-138.
- NOVAIS, G. 100 anos de Indústria de laticínios no Brasil. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p.1, 1988.
- PELLEGRINO, L.; BATTELLI, G.; RESMINI, P.; FERRANTI, P.; BARONE, F.; ADDEO, F. Alkaline phosphatase inactivation during Grana Padano cheese-making and related effects on cheese characterization and ripening. **Lait** 1997, v. 77, p. 217-220.
- RYHANEN, E. L.; PIHLANTO-LEPPALA, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat chesse with bioactive properties. **International Dairy Journal** 2001, v. 11, p. 441-447.
- ROUDOT-ALGARON, F.; LE BARS, D.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; GRIPON, J.C. Phosphopeptides from Contém cheese: nature and origin. **Journal Food Science** 1994; v. 59, p. 544-547.
- SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzyme. **Food Microbiology** 2000; v. 17, p. 129-141.
- SOUZA, E. A. Tecnologia da fabricação de queijos. Juiz de Fora: **Revista do I.L.C.T**, 116p., 1960.
- SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUARIA (SDA). Aprova o regulamento tecnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrucao Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Diario Oficial da Uniao**. Brasilia, DF, 16 jul. 2001a.
- SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal** 2005; v. 15, p. 1-15.
- SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzyme. **Food Microbiology** 2000; v. 17, p. 129-141.
- SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAMA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. **Journal of Dairy Science** 2002, v. 83, p. 1434-1440.
- SEPPO, L.; JAUHAINEN, T; POUSSA, T; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure lowering effect in hypertensive subjects. **American Journal Clinical Nutrition** 2006; v. 77, p. 326-330,

STANTON C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology** 2005; v 16, p. 198-203.

YAMAMOTO, N.; TAKANO, T. Antihypertensive peptides derived from milk proteins **Nahrung** 1999; v.43, p. 159-164.

2-OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- 1- Realizar a Caracterização Microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanais produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a qualidade do leite utilizado como matéria prima para a produção dos queijos de Coalho artesanal na Região Agreste de PE quanto aos parâmetros físico-químicos e contagem de células somáticas de acordo com a legislação pertinente;
- 2- Avaliar a qualidade do queijo de Coalho artesanal produzido na Região Agreste de PE quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de acordo com a legislação pertinente;
- 3- Analisar o perfil da microbiota ácido-láticas através da reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* espécie - específico ou gênero específico para o gênero Lactobacilos, e espécies de Lactococos, Estreptococos e Enterococos;
- 4- Obter o perfil protéico do queijo de Coalho artesanal produzido na Região Agreste de PE através de eletroforese monodimensional desnaturante (SDS-PAGE);
- 5- Estudar o perfil dos peptídeos solúveis em água, extraídos dos queijos de Coalho artesanal produzidos na Região Agreste de PE através de Espectrometria de Massas (MALDI-ToF);
- 6- Testar os extratos peptídicos obtidos a partir dos queijos de Coalho artesanal produzidos na Região Agreste de PE quanto às atividades bioativas: antioxidante, antimicrobiana e carreadora de zinco.

3-REVISÃO DE LITERATURA
(Artigo de revisão)

**Caseína Como Fonte de Peptídeos Bioativos: Atividade Antihipertensiva,
Antimicrobiana, Opióide e Antioxidante**

Roberto Afonso da Silva ^{1,2}, Vilma Sobral Bezerra ^{1,2}, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^{1,2}, Maria
Taciana Holanda Cavalcanti ^{1,2}, José Luiz de Lima Filho ²

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife – Pernambuco – Brasil;

² Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de
Imunopatologia Keizo Azami (LIKA-UFPE), Recife – Pernambuco – Brasil.

*Autor para correspondência: José Luiz de Lima Filho

joseluiz60@mac.com Tel.: 55 81 2126 8484; fax 55 81 2126 8485

Resumo: Os Consumidores estão a cada dia, mais preocupados com a manutenção da saúde e buscam cada vez mais fontes naturais alternativas para o combate ou prevenção de doenças. As caseínas podem ser uma dessas fontes, pois são as proteínas predominantes no leite, constituindo cerca de 80% de suas proteínas totais, que quando hidrolisadas geram uma grande quantidade de peptídeos bioativos, que são compostos com funções ou efeitos fisiológicos produzidos *in vivo* ou *in vitro* por hidrólise enzimática de proteínas dos alimentos. Após a administração oral, peptídeos bioativos, podem afetar processos ou substratos biológicos atuando sobre os principais sistemas do corpo, como, o cardiovascular, digestivo, imunológico e nervoso, trazendo várias propriedades benéficas à saúde. A atividade biológica desses peptídeos está baseada em sua sequência e composição de aminoácidos. As sequências ativas desses peptídeos geralmente variam de dois a vinte resíduos de aminoácidos, e muitos são conhecidos por terem propriedades multifuncionais. As atividades antihipertensiva, antimicrobiana, opióide e antioxidantes dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína do leite são discutidas nesta revisão.

Palavras-chaves: Caseína, peptídeos bioativos, antihipertensiva, antimicrobiana, opióides, antioxidantes.

Abstract: The Consumers are day by day, more concerned with maintaining health and seek more natural sources alternative to fight or prevent disease. Casein may be one of these sources, because they are the predominant proteins in milk, constituting about 80% of their total protein, which when hydrolyzed produce large amounts of bioactive peptides, which are composed with functions or physiological effects produced *in vivo* or *in vitro* by enzymatic hydrolysis of food proteins. After oral administration, bioactive peptides, can affect substrates or biological processes acting on the main body systems, as the cardiovascular, digestive, immune and nervous systems, enabling the number of the cardiovascular, digestive, immune

and nervous, bringing several beneficial properties to health. The biological activity of these peptides is based on their sequence and amino acid composition. The sequences of bioactive peptides generally range from 2-20 aminoacids residues, and many are known to have multifunctional properties. The antihypertensive activity, antimicrobial, antioxidant and opioid peptides obtained by hydrolysis of casein of milk are discussed in this review.

Keywords: Casein, bioactive peptides, antihypertensive, antimicrobial, opioids, antioxidants.

1. Introdução

As caseínas são as proteínas predominantes do leite e seus derivados, cujas funções biológicas incluem o fornecimento de fosfato e cálcio para a mineralização de alguns tecidos, provimento de aminoácidos essenciais e formação de peptídeos com atividade biológica (Rasmussen et al., 1999). Compreendem de 2,5 a 3,2% do leite fluido e aproximadamente 80% das proteínas totais do leite bovino (Korhonen et al., 1998). Os demais 20% das proteínas do leite são: proteínas do soro; proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento (Sgarbieri, 2005). Ainda podemos classificar as caseínas em quatro subgrupos: (1)- α -caseína (50%); (2)- β - caseína (33%); (3)- κ -caseína (15%) e (4)- γ -caseína (2%), sendo que as caseínas α formam uma família de proteínas com características diferentes (α_{s0} a α_{s5}). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas (Sgarbieri, 2005; Silva and Malcata, 2005).

Peptídeos produzidos *in vivo* ou *in vitro* por hidrólise enzimática de proteínas dos alimentos com função biológica ou efeitos fisiológicos são chamados de peptídeos bioativos. Este termo foi mencionado na literatura em 1950 por Mallander e a partir de 1979, diversos autores têm descrito peptídeos bioativos originários de proteínas do leite (Anne, 2000; Hans, 1997; Smacchi & Gobetti, 2000a). Estes peptídeos podem ser derivados à partir de proteínas de origem bacteriana, vegetal e animal. Possuem propriedades opióides, anti-trombóticas,

anti-hipertensivas, imunomoduladoras, antibacterianas, anti-gástricas, carreadora de minerais e hipocolesterolêmica (Silva & Malcata, 2005).

A proteólise por enzimas de ocorrência natural no leite, exógenas e a partir de culturas iniciadoras tais como as bactérias ácido-lácticas são os principais responsáveis pela geração de peptídeos bioativos durante o processamento dos laticínios promovendo o seu enriquecimento. Os peptídeos liberados a partir de proteínas dos alimentos durante a fermentação têm ganhado interesse especial, pois podem influenciar numerosas respostas fisiológicas no organismo (Smacchi & Gobbetti, 2000a).

A bioatividade das caseínas ocorre somente durante a digestão proteolítica das proteínas nativas e então são liberadas as frações peptídicas ativas (Anne, 2000), e tem-se constatado diversas possibilidades de tratamento médico através de suas atividades biológicas. Sendo assim, esta revisão focaliza as principais atividades biológicas dos peptídeos bioativos derivados da caseína.

2. Atividades Biológicas

2.1. Atividade anti-hipertensiva

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma situação clínica de natureza multifatorial caracterizada por níveis de pressão arterial (PA) elevados. No Brasil, estima-se que em torno de 15% dos indivíduos adultos possam ser considerados hipertensos, e essa prevalência aumenta com a idade. A HAS multiplica o risco de danos cardiovasculares, contribuindo para aumentar a morbimortalidade e os custos sociais com invalidez e absenteísmo ao trabalho. O controle adequado dessa situação reduz significativamente os riscos individuais e os custos sociais (SBC, 2008).

Os principais grupos de medicamentos anti-hipertensivos são os bloqueadores adrenérgicos, drogas que intervêm na transmissão simpática; os bloqueadores dos canais de

cálcio, que atuam ao bloquear a entrada de cálcio em resposta à despolarização e dilatam os vasos de capacitância; os diuréticos, que são drogas que aumentam a excreção de sódio e água do corpo, através de uma ação sobre os rins. Seu efeito primário consiste em diminuir a reabsorção de sódio e de cloreto do filtrado, sendo o aumento da perda de água secundário à excreção aumentada de sal (Rang et al., 2001), ainda podem ser utilizadas drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina, através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (FitzGerald et al., 2004).

O sistema renina-angiotensina inicia-se com o angiotensinogênio, um glicopeptídeo com peso molecular de aproximadamente 60 kDa, que é substrato da renina, uma proteinase composta por aproximadamente 350 aminoácidos, sintetizada e armazenada nas células juxtaglomerulares do rim. A renina atua sobre o angiotensinogênio, em resposta a uma queda na pressão sanguínea, depleção de sódio ou uma redução no volume plasmático, liberando a partir de sua porção N-terminal, um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina (Ondetti & Cushman, 1982). Logo após a formação da angiotensina, ocorre à clivagem de dois aminoácidos (His-Leu) de sua extremidade carboxila, formando o octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor. Esta reação é catalisada pela ECA, enzima conversora da angiotensina, ocorrendo quase inteiramente nos pulmões (Li et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado uma correlação entre diferentes peptídeos inibidores da ECA, indicando que a ligação desta é fortemente influenciada pela sequência de três peptídeos no C-terminal (Erdmann et al., 2008; Haque & Chand, 2008; López-Fandiño et al., 2006). Os peptídeos inibidores da ECA derivados da caseína representam diferentes fragmentos, que contêm em comum aminoácidos como alanina, valina e prolina em sua estrutura, sugerindo que tenham importante papel neste efeito anti-hipertensivo (Meisel, 1998).

Um dos mais antigos relatos usando peptídeos bioativos da caseína do leite com atividade anti-hipertensiva data de 1982, quando (Maruyama & Suzuki, 1982), mostraram que hidrolisados de caseína correspondendo às sequências de peptídeos f(23-24), f(23-27) e f(194-199) da α_{S1} -caseína bovina, bem como as frações f(177-183) e f(193-200) da β -caseína exibem efeito anti-hipertensivo (Maruyama et al., 1987). Hideaki et al. (1990) demonstraram que uma única administração oral ou intraperitoneal de um hidrolisado trípico de caseína e a administração oral de peptídeos inibidores da ECA diminui a pressão sanguínea. Esses autores purificaram as frações f(23-34), f(194-199) da α_{S1} - caseína e f(177-183) da β - caseína. O hidrolisado trípico da caseína também demonstrou um efeito brando na hipertensão arterial em voluntários humanos (Sekiya et al., 1992).

Peptídeos anti-hipertensivos foram encontrados em produtos lácteos processados (leite, queijo), sem qualquer papel funcional intencional (Korhonen, 2009). Lactotripeptídeos isoleucina-prolina-prolina (Ile-Pro-Pro) and valina-prolina-prolina (Val-Pro-Pro) foram encontrados a partir de leite fermentado (Nakamura et al., 1995), também varios queijos suíços contêm os mesmos tripeptídeos (Meyer et al., 2009). A concentração de Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro parece aumentar durante o processo de maturação dos queijos, atingindo 100 mg/kg, após 4-7 meses. A fração de soro de yogurt-like foi encontrada para conter um dipeptídeo Tyr-Pro, que produziu um significativo efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Yamamoto et al., 1999).

Pihlanto-Leppala et al. (1998), identificaram a atividade inibitória de ECA em peptídeos do leite fermentado com ácido láctico e posteriormente hidrolisado com enzimas digestivas. Estes relatos mostraram que os peptídeos na forma nativa não apresentam efeito anti-hipertensivo, mas após uma hidrolise subsequente o efeito inibitório pode ser observado. Esses peptídeos foram identificados na α_{S1} -caseína com as frações f(142-147), f(157-164), f(194-199) e na β -caseína obteve-se as frações f(108-113), f(177-183) e f(193-198).

Vários peptídeos bioativos têm sido obtidos em queijos como resultado da proteólise durante o processo de manufatura. Addeo et al. (1992) observaram a influencia do tempo no potencial anti-hipertensivo em queijo parmesão, onde foram isolados os peptídeos da α_{S1} -caseína após 15 meses de manufaturados. Vários peptídeos antihipertensivos foram isolados de queijos italianos pouco tempo após a manufatura (Smacchi and Gobbetti, 2000b). Gómez-Ruiz et al. (2002) e Mao et al. (2007), observaram a atividade inibitória da ECA no queijo Manchego e Qula respectivamente, usando-se diferentes culturas de *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae* e YAC (*Bos grunniens*). Os resultados mostraram que foram isolados dois potentes inibidores da ECA obtidos da β -caseína e κ -caseína e 2 novos peptídeos inibidores de ECA com as sequências de aminoácidos Pro-Pro-Glu-Ile-Asn (κ -caseína) e Pro-Leu-Pro-Leu-Leu (β -caseína) respectivamente.

Nos últimos anos vários relatos têm mostrado o uso de leite fermentado com cultura de *Lactobacillus helveticus*, originando peptídeos bioativos tais como Val-Pro-Pro (f84-86) e Ile-Pro-Pro (f74-76) da β -caseína bovina (Seppo et al., 2006), estes peptídeos mostram efeito anti-hipertensivo por serem resistentes a peptidases. Também apresentaram os valores de IC50 variando de acordo com a concentração de substrato utilizado nos experimentos *in vitro* (Lehtinen, 2010).

Peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática da caseína com pepsina e correspondentes a α_{S1} -caseína f (90-94) (RYLGY), α_{S1} -caseína f(143-149) (AYFYPEL) e α_{S2} -caseína f(89-95) (YQKFPQY) exerceram atividade anti-hipertensiva após a administração oral de SHR (Contreras et al., 2009). A **Tabela 1** mostra um resumo dos principais peptídeos bioativos antihipertensivos obtidos pela hidrólise da caseína.

2.2. Atividade antimicrobiana

O surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais gerou um crescente interesse no estudo de peptídeos naturais com atividades antiobioticas. Tais peptídeos, denominados peptídeos antimicrobianos, participam do sistema inato de defesa de animais e plantas. Atualmente, existem mais de 500 peptídeos antimicrobianos isolados e estudados. A produção de peptídeos antimicrobianos faz parte dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante as etapas iniciais de infecção e sua importância na proteção contra patógenos tem sido descrita nas últimas décadas (Hancock & Monisha, 2000; Zasloff, 2000).

Apesar das diferenças, os modos de ação dos diversos peptídeos antimicrobianos envolvem, em geral, associação com lipídeos de membrana plasmática microbiana promovendo aumento de sua permeabilidade. Em um primeiro momento ocorre uma atração eletrostática entre as moléculas de peptídeos (que geralmente possuem carga positiva) e lipídeos aniônicos presentes na membrana. Em seguida, a estrutura anfipática dos peptídeos antimicrobianos desempenham seu papel, promovendo a interação dos peptídeos antimicrobianos com a interface hidrofílica/hidrofóbica presente na superfície das biomembranas (Naghmouchi et al., 2007; Régine, 1999)

As propriedades antimicrobianas do leite têm sido amplamente estudadas e conhecidas por muitos anos. Em 1930 descobriu-se que o leite possuía atividade inibidora do crescimento da bactéria *Streptococos* sp. (Jones & Simms, 1930). Passados 20 anos, foi comprovado que proteínas alimentares também podem agir como precursores de peptídeos antimicrobianos e iniciar a defesa natural do organismo contra patógenos invasores. Consequentemente, proteínas alimentares podem ser consideradas como componentes nutricionais da imunidade (Pellegrini, 2003).

Proteínas de diferentes origens têm sido usadas para identificar peptídeos antimicrobianos, como proteínas obtidas do ovo (Ibrahim et al., 2002), espinafre (Segura et

al., 1998), geleia real (Fontana et al., 2004) e peixes marinhos (Park et al., 1997), mais a maioria dos peptídeos antimicrobianos alimentares são derivados das proteínas do leite (Bellamy et al., 1992).

Caseínas são fontes de peptídeos antimicrobianos. Estudos têm identificado fragmentos antibacterianos derivados da α_{s1} -caseína (Lahov & Regelson, 1996), κ -caseína (Malkoski et al., 2001) e α_{s2} -caseína (McCann et al., 2005; Recio & Visser, 1999; Zucht et al., 1995). McCann et al. (2005), identificaram novos peptídeos antimicrobianos através da digestão do caseinato de sódio bovino pela quimosina, todos eles, originados do C-terminal da α_{s2} -caseína bovina.

Um grupo de polipeptídeos de alto peso molecular, as casecidades foram identificados através da hidrólise da caseína pela quimosina (Lahov et al., 1971), esses peptídeos apresentaram propriedades bactericidas contra várias bactérias patogênicas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Lactobacilli*. Outro peptídeo antibacteriano, isracidina, originado através da hidrólise da α_{s1} -caseína (f1-23) por quimosina foi isolado. Isracidina inibiu o crescimento *in vitro* do *Lactobacilli* e outras bactérias Gram-positivas. *In vivo* isracidina exerceu um efeito de proteção contra *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* quando administrado em doses baixas (Lahov and Regelson, 1996). Esse peptídeo também apresentou atividade contra mastite bovina quando injetado dentro dos níveis comparáveis ao tratamento padrão com antibióticos (Haque and Chand, 2008).

A Casocidina-I foi o primeiro peptídeo antimicrobiano descrito derivado da α_{s2} -caseína (Zucht et al., 1995). É um fragmento de 39 aminoácidos, correspondendo aos resíduos 150-188, altamente catiônico com pI em torno de 10, e possui efeito antibacteriano contra *E. coli* e *S. carnosus*, e seu mecanismo de ação pode ser similar ao descrito para outros peptídeos antibacterianos conhecidos (Bradshaw, 2003). Em seguida o papel antibacteriano desse

peptídeo foi reavaliado com o objetivo de verificar a existência de domínios antibacterianos induzidos enzimaticamente. A hidrólise com a enzima gástrica pepsina, rendeu dois potentes peptídeos antibacterianos: α_{s2} -caseína f(164-179), que é uma parte da casocidina-I e um novo peptídeo f(183-207) (Recio & Visser, 1999). Ambos os fragmentos apresentaram uma importante atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Novos fragmentos antibacterianos derivados da α_{s2} -caseína foram identificados através da digestão do caseinato de sódio pela quimosina (McCann et al., 2005). Os peptídeos identificados α_{s2} -caseína f(181-207), f(175-207) e f(164-207) possuíam a região C-terminal positivamente carregada, e apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

A pesquisa com atividade antibacteriana de α_{s2} -caseína tem sido estendida para o leite de outras espécies. Quatro peptídeos antibacterianos foram identificados da α_{s2} -caseína ovina através da hidrólise pela pepsina (López-Expósito et al., 2006a). Esses peptídeos corresponderam a sequências: f(165-170), f(165-181), f(184-208) e f(203-208), os fragmentos f(165-181) e f(184-208) foram homólogos aos previamente identificados da proteína bovina.

Baranyi et al. (2003) através da digestão pela tripsina da β -caseína de coelho, identificou o peptídeo f(64-77) que apresentou elevada atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas. Os autores explicaram que a falta de atividade contra bactérias Gram-negativas é devido ao caráter aniônico desses peptídeos, que impede a interação com os lipopolissacarídeos de carga negativa que são os maiores componentes da membrana celular das bactérias Gram-negativas.

Peptídeos antimicrobianos também foram derivados da β -caseína humana f(184-210) através da hidrólise pela proteinase de *L. helveticus* PR4. Esses peptídeos inibiram um largo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias potencialmente patogênicas de interesse clínico como *Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *E. coli* K-

12, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*. Esses peptídeos encontraram características estruturais similares com a isracidina, tendo cadeia similar (26 aminoácidos), alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos apolares, com baixa carga positiva e alguns resíduos de prolina no C-terminal, o que promove a resistência a futuras degradações por tripsina e quimiotripsina (Haque and Chand, 2008).

A κ -caseína também é uma fonte de peptídeos antimicrobianos, este foi primeiramente obtido por Liepke et al. (2001), quando isolaram o peptídeo da fração f(63-117) que apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como leveduras. Em outro estudo foi demonstrado que a hidrólise da κ -caseína pela quimosina gerou o caseinínomacropéptido (CMP) f(106-169) denominado de Kappacina (forma não glicosilada) que apresentou atividade contra *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii* e *E. Coli* (Dashper et al., 2007; Malkoski et al., 2001).

O CMP é um polipeptídeo altamente heterogêneo possuindo várias formas glicosiladas e fosforiladas (Saito & Itoh, 1992; Talbo et al., 2001). Malkoski et al. (2001) demonstraram que apenas a porção fosforilada e não-glicosilada (kappacinina) é a única forma ativa da molécula. O CMP é encontrado no estômago, duodeno e jejuno de humanos, após a ingestão de leite (Ledoux et al., 1999). A liberação de kappacina no estômago, portanto, pode ser um mecanismo para limitar a infecção do trato gastrointestinal no desenvolvimento de neonatos, por aumentar a sensibilidade das bactérias ao ácido gástrico, colapsando o gradiente de cátions na transmembrana. A razão do porque, das formas glicosiladas da kappacina não possuírem atividade antibacteriana ainda não é clara (Haque and Chand, 2008).

López-Expósito et al. (2006c) estudando a produção de peptídeos antimicrobianos originados da hidrólise da kapa-caseína encontraram as seguintes frações f(18-24), f(30-32) e f(139-146), que apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas

(*Listeria innocua* e *Staphylococcus carnosus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*).

Por último, o pentapeptídeo com atividade antimicrobiana foi descrito por Marin & Monnai (2000). Esse peptídeo, chamado κ -caseidina, foi isolado pela digestão trípica da κ -caseína correspondente ao fragmento f(17-21), que inibiu o crescimento de bactérias patogênicas como *S.aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*. Também exibiu atividade citotóxica perante algumas células mamíferas, incluindo leucócitos humanos (Haque & Chand, 2008). A **Tabela 2** mostra um resumo dos peptídeos bioativos antimicrobianos obtidos pela hidrólise da caseína.

2.3. Atividade Opióide

Os peptídeos opióides são classificados em dois tipos, os típicos, também conhecidos como endógenos e são derivados de encefalinas, endorfinas e dinorfinas, e os atípicos ou exógenos que são derivados de outras proteínas como, por exemplo, as caseínas. Esses peptídeos agem como ligantes para os receptores opióides. Os efeitos fisiológicos desses peptídeos dependem do tipo de receptor, como por exemplo, receptores do tipo μ (mu) estão ligados ao controle da motilidade intestinal e comportamento emocional, os receptores δ (delta) ao controle do comportamento emocional e os receptores κ (kapa) estão relacionados à analgesia e a saciedade (FitzGerald & Meisel, 2003).

Os peptídeos opióides atípicos derivadas das proteínas do leite, podem apresentar atividade agonista ou antagonista. Os derivados da caseína são conhecidos como casomorfina e casoxinas, enquanto os derivados das proteínas do soro são conhecidos como lactorfina. As β -casomorfina são consideradas peptídeos opióides agonistas e são fragmentos da β -caseína nas frações entre (60-70) e têm sido caracterizadas como ligantes do tipo μ . Outra sequência de peptídeos agonistas também têm sido identificadas da α s1-caseína,

lactoalbumina e β -lactoglobulina (Antila et al., 1991; Meisel & Fitzgerald, 2000). Os peptídeos antagonistas são derivados da κ -caseína (casoxinas) e também da α 1-caseína (Meisel, 1998; Meisel & Fitzgerald, 2000).

Os peptídeos opióides atípicos têm sequencias N-terminal diferentes dos peptídeos opióides atípicos ou endógenos (Schanbacher et al., 1998). A característica estrutural comum entre os peptídeos opióides endógenos e exógenos, é a presença de um resíduo de tirosina na porção N-terminal (exceto os derivados da α -caseína) e a presença de outro resíduo aromático (fenilalanina ou tirosina) na terceira ou quarta posição. Esta é uma característica estrutural importante que permite ajustar o sítio de ligação dos receptores opióides. O potencial negativo, localizado em torno do grupamento hidroxil fenólico da tirosina é essencial para a atividade opióide, quando não presente resulta na ausência total da bioatividade (Hans, 1997; Teschemacher et al., 1997)

Os peptídeos opióides originados da proteólise das caseínas atuam tanto no sistema nervoso central como em órgãos periféricos produzindo vários efeitos fisiológicos. Em nível de sistema nervoso central podem promover sedação e torpor, depressão respiratória, hipotensão, regulação da temperatura corporal, regulação da ingestão de alimentos, regulação do comportamento sexual, entre outros. Em nível periférico atuam na supressão da motilidade intestinal. Tanto os peptídeos com atividade opióide como os de atividade antiopióide (antagonista) se ligam aos tecidos alvo em receptores específicos, provocando a ação opióide específica ou a inibição da atividade. Assim, peptídeos opióides oralmente administrados podem modular os processos de absorção no intestino e influenciar tal funcionamento de 2 modos: primeiro, afetando músculos lisos, que reduz o tempo de trânsito, e segundo, afetando o transporte intestinal de eletrólitos que explicam suas propriedades anti-secretórias (Antila et al., 1991).

Os primeiros peptídeos opióides descritos na literatura foram chamados de β -casomorfina (Brantl et al., 1979), que são fragmentos de β -caseína entre as frações peptídicas 60-70, principalmente nas frações f(60-63), f(60-64), f(60-65), f(60-66) e f(66-70) (Smacchi & Gobbetti, 2000a), estes peptídeos são caracterizados como ligantes do tipo- μ (Teschemacher et al., 1997). Também é descrito que a substituição da fenilalanina na posição 3 de dois análogos bovinos de β -casomorfina-7 e -5 por uma β -homo-fenilalanina reforça a afinidade pelos receptores opióides quando comparados com os peptídeos naturais (Longobardo et al., 2000). Essa sequência de aminoácidos aparece na β -caseína de ovinos e de búfalos (Petrilli et al., 1983; Richardson & Mercier, 1979). Outra sequência da β -caseína (f41-44) de leite humano também mostrou ser um peptídeo opióide com atividade agonista (Fiat et al., 1993).

Vários peptídeos com atividade opióide têm sido identificados em frações hidrolisada da caseína por enzimas digestivas (Pihlanto-Leppälä et al., 1994; Teschemacher, 2003). Peptídeos opióides derivados da β -caseína ou seus precursores foram encontrados no quimo duodenal de porcos, no plasma de bezerros recém-nascido e no intestino delgado humano mediante administração oral de caseína ou leite, e não foram detectados no plasma de mamíferos adultos, sendo assim é sugerido que apenas o intestino de neonatais é permeável as β -casomorfina. (Meisel, 1998; Meisel & Fitzgerald, 2000; Teschemacher, 2003). Por outro lado peptídeos derivados da β -caseína podem atravessar a mucosa intestinal em neonatos via transporte passivo, assim os bebês podem ficar tranquilos e sonolentos (Sturner & Chang, 1988). Em fêmeas gestantes ou mulheres em lactação, o tecido mamário também é permeável à β -casomorfina (Clare & Swaisgood, 2000). Chabance et al. (1998) mostrou que muitos dos peptídeos da α_{s1} , β , κ -caseína e caseínomacropéotídeo existem no estômago de adultos que consomem leite ou iogurte, e alguns fragmentos de caseína foram também encontrados em

nível de duodeno. Além disso, o caseinomacropéptido e o péptido N-terminal da α_{s1} -caseína mostrou ser absorvido, e foram adequadamente detectados no plasma.

β -casomorfina podem produzir analgesia, pois liberam sequências peptídicas que se ligam a receptores opióides, prolongando o tempo de trânsito gastrointestinal, modulam o transporte intestinal de aminoácidos e influenciam no metabolismo pós-prandial, pela estimulação da secreção de insulina e somatostatina (Longobardo et al., 2000). *In vivo*, os efeitos fisiológicos ocorrem quando as β -casomorfina são absorvidas como precursores de longa cadeia e hidrolisados em fragmentos bioativos menores no tecido intestinal. Depois de cruzar a mucosa intestinal, os fragmentos então reagem com os receptores localizados ao longo da área intestinal e no cérebro (Teschmacher & Brantl, 1994). Curiosamente o péptido derivado da α_{s1} -caseína, f(91-100) demonstrou possuir propriedade ansiolítica, aliviando o estresse em modelo animal e em estudos humanos. Este péptido tem sido empregado comercialmente como um ingrediente de confeitarias e bebidas não alcoólicas (Lefranc, 2001).

Três exorfina derivadas da α -caseína bovina nas frações f(90-95), f(90-96) e f(91-96) respectivamente, foram encontradas ligadas nos receptores- δ seletivos (Loukas et al., 1983). Também foi descrito um novo péptido da γ -caseína com a sequência de (Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-Glu), que possui atividade opióide *in vitro* gerada pela hidrólise triptíca da caseína (Perpetuo et al., 2003).

Outro péptido opióide β -casomorfina-4 (f60-63) pode ser obtido através de leite fermentado por uma cepa mutante de *L. helveticus* (Matar & Goulet, 1996), e em queijos a β -casomorfina pode ser ainda mais hidrolisada de maneira gradual pelas enzimas proteolíticas durante a maturação gerando um maior número de péptidos opióides (Muehlenkamp & Warthesen, 1996).

Por último, podem-se extrair sequências de aminoácidos na κ -caseína bovina, denominadas de Casoxinas A, B e C. Casoxina A corresponde à fração (f35-41: Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-Asn) enquanto que casoxina B corresponde à fração (f58-61: Tyr-Pro-Tyr-Tyr). Já a casoxina C é um opióide antagonista obtido através da digestão trípica da κ -caseína bovina, e sua sequência correspondem a fração (f25-34: Tyr-Ile-Pro-Gln-Tyr-Ile-Val-Leu-Ser-Arg), e possui a maior bioatividade (Xu, 1998). E a Casoxina D é gerada a partir α_{s1} -caseína (Clare & Swaisgood, 2000). Algumas casoxinas foram modificadas por metoxilação durante os processos de isolamento e purificação; e provaram ser mais ativas que a correspondente C-terminal, não-metoxilada do fragmento da κ -caseína. A **Tabela 3** mostra a lista dos principais peptídeos opióides originados da hidrólise da caseína.

2.4. Atividade Antioxidante

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (Krinsky, 1994). O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos presentes tanto no organismo (localizados dentro das células ou na circulação sanguínea) como nos alimentos ingeridos (Moreira & Shami, 2004). O consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra esses processos oxidativos que ocorrem no organismo. Foi descoberto que várias doenças, entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS e doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativa. Essas substâncias, também, estão ligadas a processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (Degaspari & Waszczyzny, 2004).

Espécies reativas do Oxigênio (EROs), com seus elétrons não pareados, podem atacar e danificar, praticamente, qualquer molécula encontrada no organismo. São tão ativas que, uma vez formadas, ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Ao fazê-lo, ela

podem entregar seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, mas a molécula atacada, em si, transformaram-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente sobre um tecido (Youngson, 1995). As espécies reativas de oxigênio são: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico (L^{\cdot}), entre outros. Eles são importantes nos processos biológicos de produção de energia e fagocitose (Borek, 1997). Entre as espécies, o radical hidroxila é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. Além disso, o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA (Anderson, 2000).

A caseína do leite quando hidrolisada origina moléculas biologicamente ativas, entre elas peptídeos fosforilados, que exercem efeito na biodisponibilidade do cálcio e também em outros minerais por causa do caráter altamente aniônico (FitzGerald, 1998; Kitts, 2005). Essas caseínas do leite podem ser uma excelente fonte de peptídeos antioxidantes, como por exemplo, os caseinofosopeptídeos (CCP) que exibem uma atividade antioxidante primária e secundária em modelo que avaliou a degradação da desoxirribose. Os CCP também protegeram os lipossomas de soja da oxidação gerada pela adição de íons ferro e de radicais livres como a AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropano-dihidroclorida). Esses estudos iniciais sobre o papel antioxidante dos CCP apontam efeitos benéficos da sua presença no intestino após o consumo de leite, contribuindo provavelmente para a redução do estresse oxidativo e manutenção da saúde intestinal (Kitts, 2005).

Além disso, de acordo com Diaz & Decker (2004) altas quantidades de CPP comportaram-se como pró-oxidantes, enquanto hidrolisados de caseína são apenas antioxidantes. Caseína hidrolisada e caseína de baixo peso molecular tiveram melhor potencial antioxidante que os CPP, o que pode ser explicado por uma comparação de seu

conteúdo de aminoácidos. Hidrolisados de caseína possuem um maior concentração de histidina, lisina, prolina e tirosina do que os CPP, e todos os esses aminoácidos foram previamente encontrados para atuar como eliminadores de radicais livres. Peptídeos da caseína com massa molecular em torno de 3 kDa demonstrou possuir forte atividade antioxidante em diversos métodos testados (Sakanaka et al., 2005).

Também é conhecida a habilidade do hidrolisado de caseína em sequestrar radicais livres bem como complexar metais de transição tais como o cálcio, ferro, cobre e zinco (Kim et al., 2007). A complexação de metais pelos peptídeos da caseína pode ser originada pelos resíduos de fosfoeril e glutamyl contidos na α , β e κ - caseína (Meisel, 1997) que diferem entre si pelo seu conteúdo de fosfato (10, 5 e 1 mol de caseína, respectivamente) (Sakanaka et al., 2005). A capacidade dos peptídeos de sequestrar radicais livres tem sido correlacionada positivamente com a quantidade de histidina, lisina, prolina e de tirosina, que contribuem com a atividade antioxidante de algumas proteínas e peptídeos (Kim et al., 2007). Diante dessas características, inúmeros pesquisadores sugerem que estes peptídeos podem ser usados, de maneira eficaz, como antioxidantes naturais, evitando danos oxidativos em alimentos e aumentando a vida útil dos mesmos (Sakanaka et al., 2005).

Além disso, Phelan et al. (2009), descobriram que hidrolisados de caseína, possuía capacidade para doar elétrons, conforme determinado pelo poder antioxidante por ensaios de redução do ferro (FRAP) (17-32 mM). Caseína ovina hidrolisada por protease microbiana derivada de *Bacillus* sp. P7 também demonstrou atividade antioxidante (Corrêa et al., 2011).

De acordo com alguns pesquisadores, a caseína forneceu atividade antioxidante em sistemas de peroxidação lipídica (Cervato et al., 1999). A caseína do leite também inibiu a lipoxigenase que catalisa a auto-oxidação lipídica. A eliminação de radicais livres pela oxidação de resíduos de aminoácidos da caseína foi proposta como a explicação para este fato, no entanto, aminoácidos livres não podem substituir a caseína como antioxidante, sugerindo

assim que a estrutura primária da molécula de caseína desempenha um papel fundamental em sua bioatividade (Laakso, 1984).

Vários tipos de caseína bovina também foram avaliados quanto ao seu efeito na atividade da lipoxigenase, e os domínios dentro da proteína responsáveis pela atividade inibitória foram identificados (Rival et al., 2000; Rival et al., 2001). Esses pesquisadores descobriram que a hidrólise trípica da β -caseína e a hidrólise trípica juntamente com a hidrólise utilizando a sublisina manteve os efeitos inibitórios contra a oxidação. A maior inibição da oxidação do ácido linoléico foi observada na fração da β -caseína (f169-176) e em uma pequena quantidade da β -caseína (f33-48), e os efeitos foram maiores na fração digerida quando comparado com a fração não digerida. A β -caseína (f177-183) foi um forte antioxidante, porém, quase inativa contra a oxidação do ácido linoléico induzida enzimaticamente. Entretanto, compostos como a vitamina E são considerados potentes antioxidantes, porém, também não tem significativa inibição na oxidação do ácido linoléico (Auerbach et al., 1992).

Através da digestão péptica da caseína, Suetsuna et al. (2000) isolaram o peptídeo (Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu) que possui um ânion superóxido potente em sequestrar radicais livres, e o dipeptídeo (Glu-Leu) C-terminal que mostrou ser muito importante para essa atividade. Já Kansci et al. (2004) relataram que a hidrólise trípica da β -caseína gera o peptídeo f(1-25) que protege os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) contra a oxidação induzida por ferro, principalmente devido à quelação deste íon. Em adição, a capacidade dos peptídeos da caseína em inibir as alterações deletérias induzidas por oxidação de lipídeos parece estar relacionada com a natureza e composição das diferentes frações peptídicas produzidas, sendo esta dependente da especificidade da proteinase usada para gerar o hidrolisado (Anne, 2006).

Rival et al. (2001) também estudaram a relação entre a sequência de aminoácidos e a capacidade antioxidante de peptídeos sintéticos da caseína. A maioria dos peptídeos originados da caseína mostrou atividade antioxidante, sugerindo ser oxidada por radicais livres intermediários, ou seja, formados durante a oxidação do ácido linoléico. O mesmo autor concluiu que peptídeos da caseína inibiram enzimática e não enzimaticamente a peroxidação lipídica, provavelmente por ser um alvo preferencial dos radicais de ácidos graxos livres. Os resultados com misturas equimolares de aminoácidos sugeriu que a conformação dos peptídeos pode levar tanto a efeitos sinérgicos como antagônicos em comparação com os exercidos pela mistura de aminoácidos, mostrando que as proteínas/peptídeos podem ser oxidadas em mecanismos específicos de sítios ou sequência específica da caseína.

Além disso, há evidências de que o efeito antioxidante dos aminoácidos é maior quando eles são incorporados em peptídeos, indicando que a ligação peptídica ou conformação estrutural tem uma influência nesta atividade (Hernández-Ledesma et al., 2007; Takenaka et al., 2003). Assim a composição do peptídeo pode levar a ambos os efeitos sinérgicos e antagônicos que diz respeito à atividade antioxidante de aminoácidos livres. A **Tabela 4** mostra a lista dos principais peptídeos antioxidantes originados da hidrólise da caseína

3. Conclusão

Os consumidores hoje melhor visualizam a diminuição de gastos médicos, o envelhecimento com saúde, qualidade de vida, além de neutralização de danos causados pelo meio ambiente em geral. Nesse caso os peptídeos das caseínas apresentam um excelente perfil de aminoácidos, caracterizando-as como proteínas de alto valor biológico. Possuem peptídeos bioativos que conferem a essas proteínas diferentes propriedades funcionais, tais como atividade antihipertensiva, antimicrobiana, opióides e antioxidantes. Esses ingredientes são

muito promissores para serem usados na Biotecnologia como componentes de novos fármacos, na nutrição humana como alimento funcional, bem como na produção de nutracêuticos que podem ser desenvolvidos para melhorar a saúde em geral. Uma vez que as evidências científicas sobre a eficiência dos peptídeos da caseína estão cada vez mais crescentes, trazendo uma maior segurança para o consumidor.

Tabelas

Tabela 1: Principais frações de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade anti-hipertensiva.

<i>Precursor</i>	<i>Fragmento</i>	<i>Nome</i>	<i>Referência</i>
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (23–27)	Casoquinina-5	Meisel & Chlimme (1994)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (194–199)	Casoquinina-6	Meisel & Chlimme (1994)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (102–109)	Casoquinina-8	Gómez-Ruiz et al. (2002)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (142–147), <i>f</i> (157–164)	-	Pihlanto-Leppala et al. (1998)
α_{s2} -Caseína	<i>f</i> (174–179), <i>f</i> (174–181)	-	Tauzin et al. (2002)
α_{s2} -Caseína	<i>f</i> (189–197), <i>f</i> (189–193), <i>f</i> (190–197), <i>f</i> (198–202)	-	Maeno et al. (1996)
β -Caseína	<i>f</i> (193–202)	β -casoquinina-10	Pihlanto-Leppala et al. (1998)
β -Caseína	<i>f</i> (177–183)	β -casoquinina-7	Meisel & Chlimme (1994)
β -Caseína	<i>f</i> (58–72)	-	Smacchi & Gobetti (1998)
β -Caseína	<i>f</i> (84–86)	-	Nakamura et al. (1995)
κ -Caseína	<i>f</i> (108–111), <i>f</i> (108–110)	-	Nakamura et al. (1995)
κ -Caseína	<i>f</i> (25–34)	-	Chiba et al. (1989)
γ -Caseína	<i>f</i> (108–113), <i>f</i> (114–121)	-	Perpetuo et al. (2003)

Tabela 2: Principais frações de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade antimicrobiana.

<i>Precursor</i>	<i>Fragmento</i>	<i>Nome</i>	<i>Referência</i>
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (1–23)	Isracidina	Hill et al. (1974)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (99–109)	-	McCann et al. (2006)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (21–29)	Caseicidina A	Hayes et al. (2006)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (30–37)	Caseicidina B	Hayes et al. (2006)
α_{s1} -Caseína	<i>f</i> (195–208)	Caseicidina C	Hayes et al. (2006)
α_{s2} -Caseína	<i>f</i> (150–188)	Casocidina I	Zucht et al. (1995)
α_{s2} -Caseína	<i>f</i> (164–179)	-	Recio and Visser (1999)
α_{s2} -Caseína	<i>f</i> (183–207), <i>f</i> (164–207), <i>f</i> (175–207), <i>f</i> (181–207)	-	McCann et al. (2005)
β -Caseína	<i>f</i> (164–179)	-	Sandré et al. (2001)
β -Caseína	<i>f</i> (184–210)	-	Minervini et al. (2003)
κ -Caseína	κ <i>f</i> (106–169)	Kapacinina	Malkoski et al. (2001)
κ -Caseína	<i>f</i> (43–97)	-	Liepke et al. (2001)
κ -Caseína	<i>f</i> (18–24), <i>f</i> (30–32), <i>f</i> (139– 146), <i>f</i> (42–49), <i>f</i> (28–30), <i>f</i> (162–169), <i>f</i> (141–146), <i>f</i> (118–121), <i>f</i> (64–75),	-	López-Expósito et al. (2006b)

Tabela 3: Principais frações de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade opióide.

<i>Percussor</i>	<i>Fragmento</i>	<i>Nome</i>	<i>Referência</i>
α_{s1} -Caseína	<i>f(90–95)</i>	Exorfina	Loukas et al. (1983)
α_{s1} -Caseína	<i>f(90–96)</i>	Exorfina	Loukas et al. (1983)
α_{s1} -Caseína	<i>f(91–95)</i>	Exorfina	Loukas et al. (1983)
β -Caseína	<i>f(60–70)</i>	β -casomorfina-11	Meisel (1986)
β -Caseína	<i>f(60–66)</i>	β -casomorfina-7	Brantl et al. (1981)
β -Caseína	<i>f(60–64)</i>	β -casomorfina-5	Brantl et al. (1981)
β -Caseína	<i>f(41–44)</i>	β -casomorfina-4	Fiat et al. (1993)
κ -Caseína	<i>f(35–41)</i>	Casoxina A	Xu (1998)
κ -Caseína	<i>f(58–61)</i>	Casoxina B	Xu (1998)
κ -Caseína	<i>f(25–34)</i>	Casoxina C	Xu (1998)
κ -Caseína	<i>f(158–164)</i>	Casoxina D	Xu (1998)
λ -Caseína	<i>f(158–164)</i>	-	Perpetuo et al. (2003)

Tabela 4: Principais frações de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise da caseína com atividade antioxidante.

<i>Precursor</i>	<i>Fragmento</i>	<i>Referência</i>
α_{s1} -Caseína	<i>f(144–149)</i>	Suetsuna et al. (2000)
α_{s2} -Caseína	<i>f(203–208)</i>	Recio et al. (2005)
β -Caseína	<i>f(98–105)</i>	Rival et al. (2001)
β -Caseína	<i>f(177–183)</i>	Rival et al. (2001)
β -Caseína	<i>f(169–176)</i>	Rival et al. (2001)
β -Caseína	<i>f(170–176)</i>	Rival et al. (2001)
β -Caseína	<i>f(1–25)</i>	Kansci et al. (2004)
κ -Caseína	<i>f(96–106)</i>	Kudoh et al. (2001)
κ -Caseína	<i>f(98–105)</i>	Gómez-Ruiz et al. (2008)

Referências

- Anderson, D., 2000, Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research* 350, 103-108.
- Anne, P.-L., 2000, Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology* 11, 347-356.
- Anne, P., 2006, Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* 16, 1306-1314.
- Antila, P., Paakkari, I., Järvinen, A., Mattila, M.J., Laukkanen, M., Pihlanto-Leppälä, A., Mäntsälä, P., Hellman, J., 1991, Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *International Dairy Journal* 1, 215-229.
- Auerbach, B.J., Kiely, J.S., Cornicelli, J.A., 1992, A spectrophotometric microtiter-based assay for the detection of hydroperoxy derivatives of linoleic acid. *Analytical Biochemistry* 201, 375-380.
- Baranyi, M., Thomas, U., Pellegrini, A., 2003, Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Journal of Dairy Research* 70, 189-197.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M., 1992, Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1121, 130-136.
- Borek, C., 1997, Antioxidants and cancer. *Science and Medicine*, 52-62.
- Bradshaw, J.P., 2003, Cationic Antimicrobial Peptides: Issues for Potential Clinical Use. *BioDrugs* 17, 233-240.
- Brantl, V., Teschemacher, H., Bläsigg, J., Henschen, A., Lottspeich, F., 1981, Opioid activities of β -casomorphins. *Life Sciences* 28, 1903-1909.

- Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., Lottspeich, F., 1979, Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins) I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologie und Chemie* 360, 1211-1216.
- Cervato, G., Cazzola, R., Cestaro, B., 1999, Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition Research* 50, 291-294.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P., Fiat, A.M., 1998, Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80, 155-165.
- Chiba, H., Tani, F., Yoshikawa, M., 1989, Opioid antagonist peptides derived from k-casein. *Journal of Dairy Research* 56, 363-366.
- Clare, D.A., Swaisgood, H.E., 2000, Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science* 83, 1187-1195.
- Contreras, M.d.M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M., Recio, I., 2009, Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* 19, 566-573.
- Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Coelho, J., Meira, S.M.M., Lopes, F.C., Segalin, J., Risso, P.H., Brandelli, A., 2011, Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2247-2254.
- Dashper, S.G., Liu, S.W., Reynolds, E.C., 2007, Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 13, 505-516.
- Degaspari, C.H., Waszczyński, N., 2004, Propriedades Antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica, Curitiba* 5, 33-40.

- Diaz, M., Decker, E.A., 2004, Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 8208-8213.
- Erdmann, K., Cheung, B.W.Y., Schröder, H., 2008, The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 643-654.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C.B., Caen, J., 1993, Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science* 76, 301-310.
- FitzGerald, R.J., 1998, Potential use of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal* 8, 452-457.
- FitzGerald, R.J., Meisel, H., 2003, Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advances in dairy chemistry: proteins*. Fox PH, Mc Sweeney PLH, editors. Cambridge UK. Academic/Plenum Publishers 675-698.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J., 2004, Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *Journal of Nutrition* 134, 980S-988S.
- Fontana, R., Mendes, M.A., Souza, B.M.d., Konno, K., César, L.I.M.M., Malaspina, O., Palma, M.S., 2004, Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 25, 919-928.
- Gómez-Ruiz, J., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., Recio, I., 2008, Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology* 227, 1061-1067.

- Gómez-Ruiz, J.Á., Ramos, M., Recio, I., 2002, Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal* 12, 697-706.
- Hancock, R.E.W., Monisha, G.S., 2000, The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 8856-8861.
- Hans, M., 1997, Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science* 50, 125-138.
- Haque, E., Chand, R., 2008, Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology* 227, 7-15.
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2006, Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2260-2264.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolomé, B., 2007, ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β -Lactoglobulin f(19–25). Interactions with Ascorbic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3392-3397.
- Hideaki, K., Kunio, D., Shigeru, S., Hideyo, U., Ryuji, S., Umeji, M., Shizume, T., 1990, Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 96, 367-371.
- Hill, R.D., Lahav, E., Givol, D., 1974, A rennin-sensitive bond in α_s1 β -casein. *Journal of Dairy Research* 41, 147-153.

- Ibrahim, H.R., Aoki, T., Pellegrini, A., 2002, Strategies for New Antimicrobial Proteins and Peptides: Lysozyme and Aprotinin as Model Molecules. *Current Pharmaceutical Design* 8, 671-693.
- Jones, F.S., Simms, H.S., 1930, The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk. *Journal of Experimental Medicine* 51, 327-339.
- Kansci, G., Genot, C., Meynier, A., Gaucheron, F., Chobert, J.M., 2004, β -Caseinophosphopeptide (f1-25) confers on β -casein tryptic hydrolysate an antioxidant activity during iron/ascorbate-induced oxidation of liposomes. *Lait* 84, 449-462.
- Kim, G.N., Jang, H.d., Kim, C.I., 2007, Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. *Food Chemistry* 104, 1359-1365.
- Kitts, D.D., 2005, Antioxidant properties of caseinphosphopeptides. *Trends in food science & technology* 16, 549-554.
- Korhonen, H., 2009, Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1, 177-187.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P., Tupasela, T., 1998, Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology* 9, 307-319.
- Krinsky, N.I., 1994, The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66, 1003-1010.
- Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., Oki, T., 2001, Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 48, 44-55.
- Laakso, S., 1984, Inhibition of lipid peroxidation by casein. Evidence of molecular encapsulation of 4,4-pentadiene fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 792, 11-15.

- Lahov, E., Edelsten, D., Sode-Morgensen, M.T., Sofer, E., 1971, *Milchwissenschaft* 26, 489-495.
- Lahov, E., Regelson, W., 1996, Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology* 34, 131-145.
- Ledoux, N., Mahé, S., Dubarry, M., Bourras, M., Benamouzig, R., Tomé, D., 1999, Intraluminal immunoreactive caseinomacropeptide after milk protein ingestion in humans. *Food / Nahrung* 43, 196-200.
- Lefranc, C., 2001, Cool, calm and collected. *Dairy Industries International*, June, 36-37.
- Li, G.-H., Le, G.-W., Shi, Y.-H., Shrestha, S., 2004, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 24, 469-486.
- Liepke, C., Zucht, H.-D., Forssmann, W.-G., Ständker, L., 2001, Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 752, 369-377.
- Longobardo, L., Melck, D., Siciliano, R., Santini, A., Marzo, V.D., Cammarota, G., 2000, β -Casomorphins: substitution of phenylalanine with β -homo phenylalanine increases the μ -type opioid receptor affinity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10, 1185-1188.
- López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J.Á., Amigo, L., Recio, I., 2006a, Identification of antibacterial peptides from ovine α s₂-casein. *International Dairy Journal* 16, 1072-1080.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., Recio, I., 2006b, Identification of antibacterial peptides from bovine kappa-casein, Vol 69, 2992-2997 pp.

- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., Recio, I., 2006c, Identification of antibacterial peptides from bovine kappacasein. *Journal of Food Protection* 69, 2992–2997.
- López-Fandiño, R., Otte, J., van Camp, J., 2006, Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 16, 1277-1293.
- Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R.A., Klee, W.A., 1983, Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry* 22, 4567-4573.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T., 1996, Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* Cp790. *Journal of Dairy Sciences des Aliments* 79, 1316-1321.
- Malkoski, M., Dashper, S.G., O'Brien-Simpson, N.M., Talbo, G.H., Macris, M., Cross, K.J., Reynolds, E.C., 2001, Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2309-2315.
- Mao, X.Y., Ni, J.R., Sun, W.L., Hão, P.P., Fan, L., 2007, Value-added utilization of yac milk casein for the production of angiotensin- I- converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chemistry* 103, 1282-1287.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., Suzuki, H., 1987, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α 1- casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 2557- 2561.
- Maruyama, S., Suzuki, H., 1982, A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1393-1394.
- Matar, C., Goulet, J., 1996, β -casomorphin 4 from milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* 6, 383-397.

- Matin, M.A., Monnai, M.H., 2000, Isolation and characterization of a cytotoxic pentapeptide, κ -casecidin, from bovine κ -casein digested with bovine trypsin. *Animal Science Journal* 71, 197-207.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M.J., 2005, Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164–207) region of bovine α S2-casein. *International Dairy Journal* 15, 133-143.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M.J., 2006, Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein. *International Dairy Journal* 16, 316-323.
- Meisel, H., 1986, Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from *in vivo* digests of casein. *FEBS Letters* 196, 223-227.
- Meisel, H., 1997, Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43, 119-128.
- Meisel, H., 1998, Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal* 8, 363-373.
- Meisel, H., Chlimme, E., 1994, Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins). In V. Brantl, & H. Teschemacher (Eds.), β -Casomorphins and related peptides: Recent developments (pp. 27-33). Weinheim: VCH, Germany.
- Meisel, H., Fitzgerald, R.J., 2000, Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition* 84, S27-S31.
- Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D., Sieber, R., 2009, Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *Journal of Dairy Science* 92, 826-836.

- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Ox, P.F.F., Monnet, V., M, G., 2003, Angiotensin I-convertingenzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied Environmental Microbiology* 6, 5297-5305.
- Moreira, E.A.M., Shami, N.J.I.E., 2004, Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição, Campinas* 17, 227-236.
- Muehlenkamp, M.R., Warthesen, J.J., 1996, β -Casomorphins: Analysis in Cheese and Susceptibility to Proteolytic Enzymes from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science* 79, 20-26.
- Naghmouchi, K., Drider, D., Fliss, I., 2007, Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1508-1517.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T., 1995, Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Dairy Science* 78, 1253-1257.
- Ondetti, M.A., Cushman, D.W., 1982, Enzymes of the renin angiotensin system and their inhibitors. *Annual review of biochemistry* 51, 283-308.
- Park, C.B., Lee, J.H., Park, I.Y., Kim, M.S., Kim, S.C., 1997, A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Letters* 411, 173-178.
- Pellegrini, A., 2003, Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1225-1238.
- Perpetuo, E.A., Juliano, L., Lebrun, I., 2003, Biochemical and Pharmacological Aspects of Two Bradykinin-Potentiating Peptides Obtained from Tryptic Hydrolysis of Casein. *Journal of Protein Chemistry* 22, 601-606.

- Petrilli, P.F., Addeo, F., Chianese, L., 1983, Primary structure of water buffalo β -casein tryptic and CNBr peptides. *Italian Journal of Biochemistry*. *Italian Journal of Biochemistry* 32, 336–344.
- Phelan, M., Aherne-Bruce, S.A., O'Sullivan, D., FitzGerald, R.J., O'Brien, N.M., 2009, Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *International Dairy Journal* 19, 279-285.
- Pihlanto-Leppälä, A., Antila, P., Mäntsälä, P., Hellman, J., 1994, Opioid peptides produced by in-vitro proteolysis of bovine caseins. *International Dairy Journal* 4, 291-301.
- Pihlanto-Leppala, A., Rokka, T., Korhonen, H., 1998, Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International dairy journal / published in association with the International Dairy Federation* 8, 325-331.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2001, *Farmacologia*. 4^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ.
- Rasmussen, L.K., Johnsen, L.B., Tsiora, A., Sørensen, E.S., Thomsen, J.K., Nielsen, N.C., Jakobsen, H.J., Petersen, T.E., 1999, Disulphide-linked caseins and casein micelles. *International Dairy Journal* 9, 215-218.
- Recio, I., Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Ruiz, J.A., Miguel, M., Amigo, L., López-Expósito, I., Ramos, M., Aleixandre, A., 2005, Bioactive peptides identified in enzyme hydrolysates from milk caseins and procedure for their obtention. *Europe Patent* 200501373.
- Recio, I., Visser, S., 1999, Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α 2-casein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1428, 314-326.
- Régine, M.-D., 1999, The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with

- lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462, 109-140.
- Richardson, B.C., Mercier, J.-C., 1979, The Primary Structure of the Ovine β -Caseins. *European Journal of Biochemistry* 99, 285-298.
- Rival, S.G., Boeriu, C.G., Wichers, H.J., 2000, Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxygenase Inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 295-302.
- Rival, S.G., Fornaroli, S., Boeriu, C.G., Wichers, H.J., 2001, Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 287-294.
- Saito, T., Itoh, T., 1992, Variations and Distributions of O-Glycosidically Linked Sugar Chains in Bovine κ -Casein. *Journal of Dairy Science* 75, 1768-1774.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L.R., 2005, Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 464-468.
- Sandré, C., Gleizes, A., Forestier, F., Gorges-Kergot, R., Chilmonczyk, S., Le nil, J., Moreau, M.C., Labarre, C., 2001, A Peptide Derived from Bovine β -Casein Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from Germfree and Human Flora-Associated Mice. *American Society for Nutritional Sciences* 131, 2936-2942.
- SBC., 2008, Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/6304/03.asp>.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., Gherman, L.I., Willett, L.B., 1998, Milk-borne bioactive peptides. *International Dairy Journal* 8, 393-403.

- Segura, A., Moreno, M., Molina, A., García-Olmedo, F., 1998, Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters* 435, 159-162.
- Sekiya, S., Kobayashi, Y., Kita, E., Imamura, Y., Toyama, S., 1992, Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science* 45, 513-517.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R., 2006, A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal Clinical Nutrition* 77, 326-330.
- Sgarbieri, C.V., 2005, Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. *Brazilian Journal Food Technology* 8, 43-56.
- Silva, S.V., Malcata, F.X., 2005, Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15, 1-15.
- Smacchi, E., Gobbetti, M., 1998, Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 687-694.
- Smacchi, E., Gobbetti, M., 2000a, Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17, 129-141.
- Smacchi, E., Gobbetti, M., 2000b, Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17, 129-141.
- Sturner, R.A., Chang, K.J., 1988, Opioid peptide content in infant formulas. *Pediatric Research* 23, 4-10.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H., 2000, Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 128-131.

- Takenaka, A., Annaka, H., Kimura, Y., Aoki, H., Igarashi, K., 2003, Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67, 278-283.
- Talbo, G.H., Suckau, D., Malkoski, M., Reynolds, E.C., 2001, MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide. *Peptides* 22, 1093-1098.
- Tauzin, J., Miclo, L., Gaillard, J.L., 2002, Angiotensin-Converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α 2-casein. *FEBS Letters* 531, 369-374.
- Teschemacher, H., 2003, Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1331-1344.
- Teschemacher, H., Brantl, V., 1994, Milk protein derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonist activity. In β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments, eds V. Brantl and H. Teschemacher. VCH, Weinheim. 3-17.
- Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V., 1997, Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers - Peptide Science Section* 43, 99-117.
- Xu, R.J., 1998, Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Reviews International* 14, 1-16.
- Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T., 1999, Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science* 82, 1388-1393.
- Youngson, R., 1995, *Como Combater os Radicais Livres: O Programa de Saúde dos Antioxidantes*. Rio de Janeiro: Campos, 168p.
- Zasloff, M., 2000, Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zucht, H.D., Raida, M., Adermann, K., Magert, H.J., Forssmann, W.G., 1995, Casocidin-I: a casein- α 2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters* 372, 185-188.

CAPÍTULO I

Artigo Submetido à Revista:



1 **Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de Coalho artesanal produzido na**
2 **Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil**

3

4 Roberto Afonso da Silva^{1,3}, Pedro Arturo Bismara³, Rosemary Batista de Moura³, José5 Luiz de Lima Filho^{2,3}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{1,3,4}, Maria Taciana Holanda6 Cavalcanti^{1,3,4*}

7

8 ¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE –Universidade Federal
9 Rural de Pernambuco UFRPE – Recife, Brasil10 ² Departamento de Bioquímica / UFPE – Recife, Brasil11 ³ LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/UFPE – Recife, Brasil12 ⁴ LABTECBIO – Laboratório de tecnologia de produtos bioativos/DMFA/UFRPE –
13 Recife, Brasil.

14

15 *Autor de Correspondência: Rua Capitão Manoel de Araújo Miranda 163, Cordeiro,
16 Recife, Pernambuco. Tel.: (081) 32267009/99488856 Endereço de e-mail:

17 mtcvsoares@yahoo.com.br (Maria Taciana Holanda Cavalcanti).

18

19 **RESUMO**20 O objetivo desta pesquisa foi avaliar a qualidade microbiológica e perfil ácido-lático do
21 queijo de Coalho artesanal. Quanto à qualidade microbiológica, todas as amostras de
22 queijo analisadas apresentaram coliformes totais, termotolerantes e presença de
23 *Escherichia coli*, porém com os valores dentro dos padrões estabelecidos pela legislação
24 vigente no país, podendo ser consideradas próprias para consumo humano. O perfil

1 ácido-lático estudado mostrou uma microbiota heterogênea, sendo constituída por todos
2 os gêneros testados, ou seja, lactobacilos, lactococos, estreptococos e enterococos,
3 sendo confirmadas as espécies: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,
4 *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*.

5 **Palavras- chave:** Queijo de Coalho artesanal, reação em cadeia da polimerase, bactérias
6 ácido-láticas.

7

8 **ABSTRACT**

9 The aim of this study was to evaluate the microbiological quality and lactic-acid profile
10 of Artisanal “Coalho” cheese. All cheese samples analyzed showed total coliforms,
11 thermotolerants, and presence of *Escherichia coli*, but all the values within the
12 standards established by current legislation in the country, then it could be considered a
13 food fit for human consumption. The cheese showed a heterogeneous microbiota, being
14 constituted of all tested genus, such as lactobacilos, lactococos, estreptococos and
15 enterococos, and confirmed the species: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,
16 *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*.

17

18 **Key works:** Artisanal “Coalho” cheese, polymerase chain reaction, lactic-acid bacteria

19

20 **INTRODUÇÃO**

21 A produção de queijo de Coalho representa uma atividade bastante significativa
22 para a economia regional, visto que em determinadas localidades é a principal fonte de
23 renda e sobrevivência da população (Almeida et al., 2010). No Nordeste do Brasil a
24 maior parte da produção de queijo de Coalho é realizada em pequenas e médias

1 queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o
2 que torna essa atividade como importante no âmbito social e econômico (Perry, 2004).

3 De acordo com Almeida et al., (2010), o queijo de Coalho é uma representação
4 genuína da tradição e cultura do Estado de Pernambuco, onde está sendo desenvolvido
5 um trabalho de certificação desse queijo visando uma identidade própria que irá
6 diferenciá-lo dos demais produzidos na região Nordeste.

7 As propriedades organolépticas típicas e aroma particular dos queijos obtidos
8 com leite cru, tais como o queijo de coalho artesanal, estão associadas com atributos do
9 próprio leite, relacionado à raça e ao tipo de nutrição das vacas; o processo de
10 fabricação básica do queijo tradicional e a microbiota natural autóctona (responsáveis
11 pela fermentação e maturação) próprias da região produtora (Beresford et al., 2001;
12 Giannino et al., 2009). O conhecimento sobre essa microbiota ácido-láctica especial é
13 importante para assegurar qualidade, autenticidade e rastreabilidade do produto
14 artesanal com indicação de origem e proteção de origem controlada (Giannino et al.,
15 2009).

16 O estudo da diversidade microbiana desses produtos artesanais está sendo
17 realizado com o auxílio de técnicas que utilizam o DNA, dentre elas a reação em cadeia
18 da polimerase (PCR). A amplificação de regiões específicas através de “*primer*”
19 promove a identificação de gêneros e espécies garantindo uma maior rapidez nos
20 resultados (Giannino et al., 2009; Dolci et al., 2008a).

21 O objetivo desta pesquisa foi analisar a microbiota bacteriana do queijo de
22 Coalho artesanal da Região Agreste de Pernambuco, quanto à qualidade microbiológica
23 e o perfil ácido-lático através da técnica de PCR, visando à contribuição para uma futura
24 indicação geográfica.

25

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 Os queijos de Coalho artesanais foram coletados em unidades fabris com selo da
3 Adagro-PE (Agência de defesa e fiscalização agropecuária de Pernambuco), prontos
4 para a comercialização nos meses de março e julho de 2008, nos seguintes municípios:
5 Venturosa, Correntes, Capoeiras, Arcoverde, e em duas unidades sem registro situadas
6 em São Bento do Una e Cachoeirinha, todos localizados na região Agreste de
7 Pernambuco, sendo acondicionados em caixas isotérmicas e imediatamente
8 transportados para o LIKA-UFPE (Laboratório de Imunopatologia Keizo- Asami –
9 UFPE), onde foram mantidas a 10°C, até o momento das análises.

10 As amostras de queijo utilizadas nos experimentos foram analisadas quanto a
11 parâmetros da qualidade microbiológica no Laboratório de Experimentação e Análises
12 de Alimentos – LEAAL, localizado no Departamento de Nutrição da Universidade
13 Federal de Pernambuco, para pesquisa de coliformes totais (AOAC/ 2002 (991.14) e
14 para coliformes termotolerantes AOAC/2002 (986.33).

15 Para avaliar o perfil das bactérias ácido-láticas das amostras coletadas, os
16 queijos foram homogenizados em solução citrato trisódico esterilizado (2% p/v), na
17 proporção de 1g de queijo para 9 mL de solução, maceradas manualmente com a ajuda
18 de um almofariz até obter um homogenato, que foi posteriormente centrifugado a
19 25.758xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente macerado, essa
20 operação foi realizada por 3 vezes. O precipitado encontrado ao final foi utilizado para
21 identificar o perfil de bactérias ácido-láticas utilizando “*primers*” espécie-específicos
22 (Tabela 1). A amplificação foi realizada da seguinte forma: desnaturação inicial a 94°
23 por 3 min, seguidos por 30 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 30 segundos;
24 Anelamento: variável de acordo com os “*primers*” usado 30 segundos e extensão a 72°C
25 por 30 segundos; um passo final de extensão a 72° C por 5 min. Após a amplificação

1 por PCR, o material foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1%,
2 dissolvido em tampão TEB (89 mM Trizma base, 89 mM ácido bórico, 20 mM EDTA)
3 pH 8,0, corado com Gel Red (Uniscience do Brasil, São Paulo Ltda).

4

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

6 Os resultados obtidos na avaliação da qualidade microbiológica do queijo de
7 Coalho estão apresentados na Tabela 2. Todas as amostras de queijos avaliadas
8 apresentaram coliformes totais e termotolerantes. Os coliformes totais variaram de no
9 mínimo de $2,82 \times 10^2$ NMP/g para o queijo do Município de Arcoverde e máximo de
10 $1,09 \times 10^3$ NMP/g para o queijo do Município de Capoeiras. Os coliformes
11 termotolerantes apresentaram valores de 1NMP/g para os Municípios de Arcoverde,
12 Correntes e São Bento do Una e máximo de 8,78 NMP/g para Cachoeirinha. Entretanto,
13 todos os valores estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente RDC 12
14 (Brasil, 2001), que apresenta um limite de tolerância para coliformes termotolerantes de
15 $5,0 \times 10^2$ NMP/g de amostra e $5,0 \times 10^3$ NMP/g para coliformes totais. Essa
16 conformidade com a legislação observada nos nossos resultados, também foram
17 encontrados por outros autores: Feitosa et al., (2003) quando estudaram micro-
18 organismos indicadores de higiene em queijos produzidos no Rio Grande do Norte e
19 constataram a presença de coliformes termotolerantes em 36,4 % das amostras
20 estudadas, com níveis de 3 a 7 NMP/g, dentro do limite descrito na legislação.
21 Entretanto, outros autores encontraram limites acima do permitido pela legislação, tais
22 como: Borges et al., (2003) quando estudaram queijos Coalho produzidos no Estado do
23 Ceará, onde confirmaram a presença de coliformes totais e termotolerantes em todas as
24 amostras avaliadas, sendo 74,4% delas apresentaram limites acima do permitido pela
25 legislação; Paiva et al., (1999) constataram que 60% das amostras de queijo Coalho

1 artesanal, comercializadas no Estado do Rio Grande do Norte, apresentavam níveis de
2 coliformes em desacordo com a legislação; Bruno et al., (2005) verificaram que 100%
3 das amostras de queijo Coalho comercializados na cidade de Fortaleza apresentavam
4 níveis de coliformes totais e termotolerantes acima dos padrões vigentes de acordo com
5 RDC 12 (Brasil 2001); Duarte et al., (2005) quando estudaram micro-organismos
6 indicadores de higiene em queijos de Coalho produzidos e comercializados em
7 Pernambuco, encontraram a presença de coliformes termotolerantes em valores acima
8 do aceitável em 44,10% das amostras avaliadas; Santana et al., (2008) avaliando a
9 qualidade microbiológica de queijo Coalho comercializado em Aracaju, determinaram
10 que 93,3% das amostras analisadas apresentavam valores acima do recomendado para
11 coliformes totais e 80% para os termotolerantes; Oliveira et al., (2010) quando
12 estudaram a qualidade microbiológica do queijo de Coalho comercializado no
13 município do Cabo de Santo Agostinho, em Pernambuco, encontraram que 80,95% das
14 amostras estudadas apresentaram valores superiores a 500 NMP/g, acima do limite
15 estabelecido pela legislação vigente, sendo observada a presença de *E. coli* em 64,29%
16 dessas amostras. Todos os autores citados acima atribuíram os resultados obtidos à falta
17 de condições higiênico-sanitárias adequadas na produção e/ou na comercialização
18 desses produtos.

19 Com o objetivo de conhecer quais as principais espécies que interagem
20 promovendo o sabor inigualável que possui o queijo de Coalho artesanal da Região
21 Agreste do Estado de Pernambuco, a sua microbiota ácido-lática foi avaliada. Os
22 resultados obtidos da avaliação da microbiota láctica estão apresentados na Fig. 1A a 1F.

23 De acordo com os resultados encontrados a população bacteriana do queijo de
24 Coalho da região Agreste de Pernambuco é heterogênea, haja vista que todos os gêneros
25 e as espécies testadas foram encontrados, sendo, portanto o sabor diferenciado presente

1 nesse queijo em decorrência dessa associação microbiana. E que a intensidade das
2 bandas encontradas está relacionada com a quantidade de bactérias de cada tipo, pois a
3 própria população bacteriana extraída diretamente do queijo foi usada como amostra
4 para a identificação por biologia molecular.

5 Esse tipo de interação, entre gêneros e espécies, não é privilégio do queijo de
6 Coalho, mais está presente em vários produtos artesanais, assim de acordo com Ogier et
7 al., (2004) numerosos produtos lácteos representam um ecossistema microbiano
8 complexo, associados a grande diversidade de sabores, aromas e texturas. Muitas
9 bactérias têm uma contribuição positiva para a qualidade organoléptica dos queijos ou
10 leites fermentados.

11 Vários outros autores vêm encontrando uma diversidade bacteriana ao estudarem
12 queijos artesanais de várias partes do mundo, sempre associando um ecossistema
13 complexo as características organolépticas diferenciada nestes produtos, da mesma
14 forma que os resultados obtidos neste trabalho, onde os principais gêneros de bactérias
15 ácido-láticas estão presentes formando um comunidade estrategicamente organizada.
16 Dentre esses autores estão Serhan et al., (2009) quando estudaram a diversidade
17 bacteriana presente em um queijo artesanal libanês produzido com leite cru de cabra,
18 afirmaram que entre as bactérias ácido – láticas os gêneros mais comuns eram
19 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e que queijos
20 produzido com leite cru e seguindo processos tradicionais de fabricação apresentam
21 uma diversidade microbiológica, que precisa ser conhecida para que haja a manutenção
22 de produtos artesanais típicos com tradição cultural. Vale ressaltar que esta mesma
23 associação foi observada no queijo de Coalho produzido na região Agreste de
24 Pernambuco.

1 A Fig. 1A corresponde aos resultados obtidos para o gênero *Lactobacillus*
2 obtendo-se confirmação em 100 % das amostras analisadas. A presença desse micro-
3 organismo é comum em produtos derivados de leite, sendo importante na qualidade
4 organoléptica deles. No estudo de Serhan al., (2009), com amostras de queijo Darfiyeh
5 da Líbia, 44,93% das bactérias isoladas foram *Lactobacillus curvatus* e *L. plantarum*,
6 sendo este último confirmado por TGGE (temperatura de gradiente em gel de
7 eletroforese), como a principal espécie de lactobacilos do queijo.

8 Na sequência a Fig. 1 B, C e D, apresentam os resultados obtidos na eletroforese
9 dos produtos de PCR para *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e o gênero *Enterococcus*,
10 com 100% de confirmação nas amostras analisadas. Os dados encontrados para esses
11 micro-organismos estão de acordo com vários relatos sobre a análise da microbiota de
12 queijos de origem artesanal em várias partes do mundo, tais como: queijo São Jorge,
13 produto produzido em Portugal (Kongo et al., 2007), queijo Raschera proveniente da
14 Itália (Dolci et al., 2008b), Darfiyeh encontrado na Líbia (Serhan et al., 2009), queijos
15 espanhóis artesanais a partir de leite de cabra (Martín-Platero et al., 2009), queijo
16 Fontina originado da Itália (Giannino et al., 2009), e queijo Istriano presente na Croácia
17 (Fuka et al., 2010).

18 Os autores acima citados sempre relacionam a importância das espécies do
19 gênero enterococos aos aspectos organolépticos dos produtos artesanais, ressaltando a
20 participação na maturação dos queijos, segundo Beresford et al., (2001) especialmente
21 os da região mediterrânea, afirmando o forte e positivo efeito sobre o desenvolvimento
22 de seus aromas e sabores.

23 A interação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* com outras bactérias ácido –
24 lácticas, também é importante para a formação dos produtos artesanais, como observados
25 por Kongo et al., (2007), que identificaram as espécies de bactérias ácido-lácticas

1 dominantes presentes no queijo São Jorge, um queijo típico português. Os resultados
2 indicaram que *Lactobacillus* seguidos pelos *Enterococcus* foram os gêneros dominantes,
3 sendo as espécies mais frequentes *Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus*, *E. faecalis* e
4 *E. faecium*.

5 Outro queijo artesanal onde há associação dos enterococos com outras bactérias
6 ácido lácticas, é o queijo Darfiyeh, que foi estudado por Sehran et al., (2009), esses
7 autores encontraram os enterococos fazendo parte da microbiota do produto analisado,
8 apresentando este fato como comum para os queijos da região Mediterrânea produzidos
9 com leite cru a partir de várias espécies animais. Esses autores citam o *E. faecium* e o
10 *Lactococcus lactis* subs. *lactis* como os principais micro-organismos responsáveis pelas
11 características peculiares desse tipo de queijo. Fuka et al., (2010) também encontraram
12 os enterococos participando ativamente da microbiota do queijo Istriano e reconheceram
13 a importância desse gênero como responsável pelo sabor e aroma típicos desse produto.

14 Os resultados apresentados na Fig. 1E demonstram que em 100 % das amostras
15 de queijo testadas para *Streptococcus thermophilus* foi encontrado DNA desta bactéria.
16 Esse microrganismo também está presente em outros queijos artesanais, tais como no
17 queijo italiano “Toma Piemontese” de denominação de origem protegida, onde os
18 autores Fortina et al., (2003), utilizando o mesmo “primer” descrito neste trabalho,
19 identificaram o *Streptococcus thermophilus* como componente minoritário da
20 microbiota característica; Ercolini et al., (2008) encontraram no queijo Caciocavallo
21 silano, um queijo italiano artesanal com denominação de origem protegida (PDO), o
22 *Streptococcus thermophilus* como parte da microbiota específica desse produto.

23 Os resultados obtidos para Lactococos mostraram a presença em 100 % das
24 amostras testadas como apresentado na Fig. 1 F, sendo a espécie *Lactococcus lactis*
25 subs *lactis* confirmada através de PCR. Esse dado é importante, pois de acordo com

1 Flórez et al., (2006), o *Lactococcus lactis* é uma bactéria ácido-lática usada
2 mundialmente como um organismo iniciador em indústrias lácticas para a fabricação e
3 maturação de queijos e outros produtos fermentados. O desenvolvimento do *L. lactis* no
4 leite proporciona ótimas condições para a formação do coágulo, previne o crescimento
5 de bactérias patogênicas e cria condições bioquímicas ideais para a maturação. Além
6 disso, *L. lactis* participa no desenvolvimento da textura e sabor do queijo por via
7 proteolítica e de sistemas catabólicos de aminoácidos.

8 A presença de *L. lactis* subs *lactis* é comum no leite e em produtos frescos como
9 o queijo de Coalho, pois durante o processo de maturação, essas bactérias apresentam
10 dificuldades fisiológicas de sobrevivência devido às condições ambientais do produto
11 como diminuição da atividade de água, acidificação e proteólise intensas produzidas por
12 outras bactérias do ecossistema. Este fato foi ressaltado por Dolci et al., (2008)a,
13 quando avaliaram a dinâmica da microbiota dominante durante o processo de fabricação
14 e maturação do queijo Castelmagno (Denominação de Origem Protegida). Neste estudo,
15 esses autores analisaram amostras do leite, da massa e do queijo em diferentes estágios
16 de maturação, sendo a identificação das espécies realizadas por PCR-DGGE
17 (Desnaturante Gradiente Gel de Eletroporese), onde o *L. lactis* subs *lactis* foi à espécie
18 mais frequentemente encontrada durante o processo de fabricação, enquanto
19 *Lactobacillus plantarum* e *L. paracasei* foram isolados com maior frequência nos
20 queijos maturados. Entretanto, esses mesmos autores, Dolci et al., (2008)b, quando
21 estudaram o queijo artesanal italiano Raschera com denominação de origem protegida
22 (PDO), encontraram o *L. lactis* subs *lactis* como bactéria principal durante todo o
23 processo de fabricação e maturação desse tipo de queijo. Desta forma é sugerido que a
24 presença dessa bactéria ao longo de todo o processo de fabricação e maturação deverá

1 ser sempre analisada, pois dependendo das condições intrínsecas do produto ela pode
2 ser eliminada.

3

4 **CONCLUSÃO**

5 Esse estudo sugere que as características organolépticas do produto estão
6 baseadas em um ecossistema heterogêneo com a interação de todos os gêneros testados,
7 estando a qualidade sanitária dos queijos de Coalho utilizados como amostras dentro da
8 legislação vigente, sendo necessário um acompanhamento para melhorar a qualidade do
9 produto.

10

11 **AGRADECIMENTOS**

12 Agradecemos Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de
13 Pernambuco (FACEPE), ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), a
14 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), a Universidade Federal de
15 Pernambuco (UFPE), aos Laticínios produtores de queijo de Coalho dos Municípios
16 estudados do Agreste do Estado de Pernambuco, aos técnicos em laticínio Benoit
17 Paquereau e Torquato Marques dos Santos.

18

19 **REFERÊNCIAS**

20 ALMEIDA, S.L. et al. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da
21 tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. *RIAE - Revista Ibero-*
22 *Americana de Estratégia*, São Paulo, v. 9, n. 2, mai./ago, p. 74-97, 2010.

23 AOAC. Official Methods of Analysis (991.14). Coliforms and Escherichia coli Counts
24 in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm Count Plate) Methods (3M Microbiology,
25 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA), 2002.

- 1 AOAC. Official Methods of Analysis (986.33). Bacterial and Coliform Counts in Milk,
2 Dry Rehydratable Film Method (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul,
3 MN 55144 USA), 2002.
- 4 BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, v.11,
5 p.259- 274, 2001.
- 6 BORGES, M. F. et al. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no
7 Ceara, Brasil. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 21, no.
8 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.
- 9 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento
10 Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República*
11 *Federativa do Brasil*, Brasília, Resolução RDC n. 12, p.1-54, 02/01/2001.
- 12 BRUNO, L. M. et al. Avaliação microbiológica de queijo de coalho artesanais e
13 industrializados comercializados em Fortaleza, CE. *Revista do Instituto de Laticínios*
14 *Cândido Tostes*, v. 60, no. 345, p. 217-220, jul./ago, 2005.
- 15 CHENG, S. et al., PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. l*
16 *Microbiol.*, v. 35, n. 5, p. 49-56, 1997.
- 17 CORROLER, D.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. Correlation between
18 polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly
19 amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy
20 Lactococcus isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. 91-99, 1999.
- 21 DOLCI, P. et al. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese,
22 with a focus on lactic acid bacteria ecology. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 122, n.3, p.302-
23 311, 2008a.

- 1 DOLCI, P. et al. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese:
2 Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, v.25, n.2, p.392-399,
3 2008b.
- 4 DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, S.P. Detection of glycopeptide
5 resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant
6 enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.1, p.24–27, 1995.
- 7 DUARTE, D. A. M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos
8 indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no
9 estado do Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, no. 3, p. 297-302, jul./set. 2005.
- 10 ERCOLINI, D. et al. Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the
11 production of CaciocavalloSilano PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.124, n.2,
12 p.164-170, 2008.
- 13 FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos
14 indicadores higiênico- sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do
15 Norte. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 23, n. 3 (suplemento), p. 162-165,
16 set./dez., 2003.
- 17 FUKA, M. M. et al. Bacterial communities associated with the production of artisanal
18 Istrian cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.142, v.1-2, p.19-24, 2010.
- 19 FORTINA, M.G. et al. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in
20 an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese.
21 *Food Microbiol.*, v. 20, n.4, p. 397-404, 2003.
- 22 FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Microbial diversity and succession during the manufacture
23 and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by
24 PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 110, n.2, p.165-171, 2006.

- 1 GIANNINO, M. L. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for
2 Fontina cheese production by culture independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*,
3 v.130, n.3, p.188-195, 2009.
- 4 KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin.*
5 *Microbiol.*, v. 37, n.11, p. 3497-3503, 1999.
- 6 KONGO, J. M. et al. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São
7 Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *J. Appl. Microbiol.*, v. 103,
8 n.5, p.1838-1844, 2007.
- 9 LICK, S. et al. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific
10 PCR amplification based on its *lacZ* gene. *Systematic Applied Microbiology*, v. 19, n.1,
11 p. 74-77, 1996.
- 12 MARTÍN-PLATERO, A.M. et al. Polyphasic study of microbial communities of two
13 Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiol*, v.26,
14 n.3, p.294-304, 2009.
- 15 OGIER, J.C et al. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of
16 temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ.*
17 *Microbiol.*, v.70, n.9, p.5628-5643, 2004.
- 18 OLIVEIRA, K.A. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado
19 no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São
20 Paulo, v.77, n.3, p.435-440, jul./set., 2010.
- 21 PAIVA, M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado
22 produzidos no Rio Grande do Norte. *Hig. Aliment.*, Sao Paulo, v.13, n. 61, p. 33-37,
23 jan./fev., 1999.
- 24 PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim.*
25 *Nova*, v.27, p.293-300, 2004.

- 1 SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em
2 Aracaju, SE. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.1517-1522, 2008.
- 3 SERHAN, M. et al. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk
4 cheese. *Food Microbiol.*, v.26, n.6, p.645-652, 2009.
- 5 WARD, L.J.H.; TIMMINS, M. J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*
6 *paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters Applied*
7 *Microbiology*, v. 29, p. 90-92, 1999.
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Tabela 1. *Primers* espécie-específicos usados para caracterizar o perfil bacteriano ácido-lático dos queijos de Coalho produzidos nos municípios da Região Agreste do Estado de Pernambuco.

Primer	Sequência (5' para 3')	Alvo Específico	Produto do PCR (pb)	Referência
Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	Enterococos	252	Ke et al., 1999.
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
EM1A	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	<i>Enterococcus faecium</i>	658	Cheng et al., 1997.
EM1B	TATGACAGCGACTCCGATTCC			
E1	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	<i>Enterococcus faecalis</i>	635	Dutka- Malen et al., 1995.
E2	ACGATTCAAAGCTAACTG			
St1	CACTATGCTCAGAATACA	<i>Streptococcus thermophilus</i>	968	Lick et al., 1996.
St2	CGAACAGCATTGATGTTA			
His1	CTTCGTTATGATTTTACA	<i>Lactococcus lactis</i>	933	Corroler et al., 1999.
His2	CAATATCAACAATTCCAT			
	TGCACTGAGATTCGACTTAA	<i>Lactobacillus casei</i>	550	Ward e Timmins, 1999.

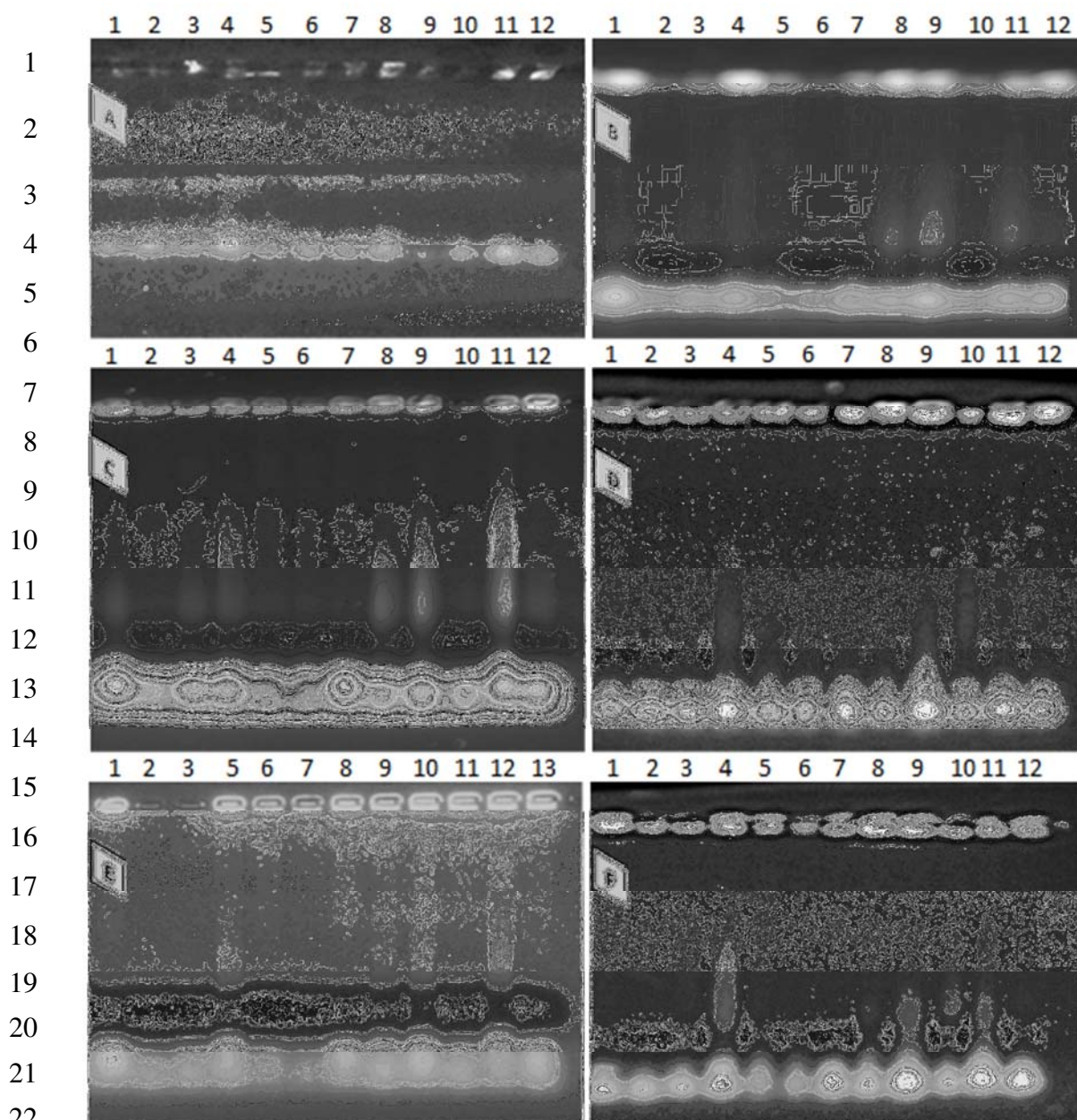
10
11
12
13
14
15
16

1
2
3
4
5
6
7
8

Tabela 2. Análises microbiológicas dos queijos de Coalho artesanais provenientes de municípios da Região Agreste do Estado de Pernambuco.

Amostra	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	
Arcoverde	$2,82 \times 10^2$	< 1	11
Cachoeirinha	$12,59 \times 10^2$	$8,78 \times 10$	12
Capoeiras	$1,09 \times 10^3$	$6,99 \times 10$	
Correntes	$1,46 \times 10^2$	< 1	13
São Bento do Una	$7,63 \times 10^2$	< 1	14
Venturosa	$3,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10$	15

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27



24 Figura 1- Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos em (PCR) reação em
 25 cadeia da polimerase. (A) *primer* gênero específico para Lactobacilos. (B) *primer*
 26 espécie-específico para *Enterococcus faecalis*. (C) *primer* espécie-específico para
 27 *Enterococcus faecium*. (D) *primer* gênero específico para Enterococos. (E) *primer*
 28 espécie específico para *Streptococcus thermophilus* e (F) *primer* espécie-específico para
 29 *Lactococcus lactis*. Os Poços (1-6) março/2008: Cachoeirinha, Arcoverde, São Bento do
 30 Una, Capoeiras, Correntes e Venturosa. Os Poços (7-12) amostras de julho/2008:
 31 Cachoeirinha, Arcoverde, São Bento do Una, Capoeiras, Correntes e Venturosa.

32

33

CAPÍTULO II

Artigo Submetido à Revista:

**ARQUIVOS do
INSTITUTO BIOLÓGICO**

Journal of Animal, Plant Sanitary and Environmental Protection

1 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E DA QUALIDADE
2 FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE E DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL
3 PRODUZIDO NA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO - BRASIL

4
5
6 **R.A. Silva^{1,2}, G.M.P. Dias¹, A.L.F Porto^{1,2}, J.L.L. Filho², M.T.H. Cavalcanti^{1,2*}**

7
8 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros,
9 s/n, Dois Irmãos, 52171-900 - Recife, Pernambuco - Brazil.

10 ² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de
11 Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50780-901 -
12 Recife, Pernambuco - Brazil.

13
14 *Autor de Correspondência: Rua Capitão Manoel de Araújo Miranda 163, CEP 50640-
15 230, Cordeiro, Recife, Pernambuco. Tel.: (081) 32267009/99488856 Endereço de e-
16 mail: mtcvsoares@yahoo.com.br (Maria Taciana Holanda Cavalcanti).

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **RESUMO**

2 O queijo de Coalho Artesanal é um produto tipicamente nordestino e muito popular,
3 amplamente consumido pela população local, e sua produção sinaliza uma importante
4 atividade no âmbito socioeconômico da Região. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a
5 contagem de células somáticas e a qualidade físico-química do leite e do queijo de
6 Coalho artesanal produzido na Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil. Os
7 parâmetros físico-químicos e CCS médios do leite para os municípios avaliados
8 estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação federal vigente, com valores
9 de proteínas entre: 2,99% a 3,48%, gordura: 3,24% a 4,0%, EST: 10,79% a 12,49%,
10 lactose: 4,26% a 4,61% e CCS: $9,2 \times 10^4$ a $5,28 \times 10^5$ células/mL. Em relação ao queijo
11 os resultados encontrados foram: umidade: 52,76% a 58,37%, proteína: 17,04 a 21,59%,
12 lipídeos: 21,25% a 27% e lactose 3,54% a 5,01%, sendo o queijo classificado como de
13 alta a muito alta umidade e magro a semi-gordo de acordo com legislação.

14 **PALAVRAS-CHAVE:** queijo de Coalho Artesanal, leite, contagem de células
15 somáticas, físico-química.

16

17 **ABSTRACT**

18 The Artisanal “Coalho” cheese is a product typically northeastern and very popular,
19 largely consumed by local population, and their production meaning an important
20 socioeconomic activity within the region. The aim of this study was to evaluate
21 somatics cells count and the physico-chemical quality and CCS of milk and artisanal
22 “Coalho” cheese produced in Agreste Region of the Pernambuco State - Brazil. The
23 average physico-chemical parameters of milk to the evaluated municipalities were
24 within the limits established by actual federal legislation, with protein values among:
25 2.99% to 3.48%, lipids: 3.24% to 4.0% EST: 10.79% to 12.49%, lactose: 4.26% to

1 4.61% and CCS: 9.2×10^4 to 5.28×10^5 cells/mL. In relation of cheese the results were:
2 humidity: 52.76% to 58.37%, protein: 17.04 to 21.59%, lipids: 27% to 21.25% and
3 lactose: 3.54% to 5.01%, being classified as cheese for high to very high humidity and
4 lean to semi-fat in accordance with legislation

5 **KEYWORDS:** Artisanal “Coalho” cheese, milk, somatics cells count, physico-
6 chemical.

7

8 **INTRODUÇÃO**

9 O queijo de Coalho Artesanal é um produto típico da Região Nordeste do Brasil
10 fabricado principalmente nos Estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e
11 Paraíba. Este queijo se destaca entre os principais tipos de produtos artesanais de
12 fabricação e consumo comprovadamente incorporados à cultura regional de tradição
13 secular, transferida de geração em geração. É um produto extensamente apreciado pelo
14 nordestino quer seja assado na brasa, quer seja frito, embora também esteja ganhando
15 novos consumidores na Região Sudeste por causa de seu sabor peculiar e
16 principalmente sua maneira de consumo (MUNCK, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2010).

17 No Estado de Pernambuco, especificamente, a produção de leite e derivados
18 constitui um dos principais suportes econômicos nas microrregiões do Vale do Ipojuca,
19 Vale do Ipanema e Garanhuns, além de uma importância relativa na Zona da Mata,
20 Sertão do São Francisco, Sertão do Araripe e Sertão do Pajeú. Estes fatos demonstram a
21 relevância econômica e social da produção de queijo para o estado pernambucano,
22 especialmente no que diz respeito aos pequenos produtores do Agreste e Sertão
23 (ALMEIDA *et al.*, 2009).

24 Nos produtos artesanais produzidos com leite cru, os parâmetros físico-químicos
25 da matéria prima, que determinam a qualidade dela, e desta forma a do produto final,

1 adquirem uma grande importância. Pois, de acordo com SENA *et al.* (2000), a
2 composição físico-química do produto varia conforme a matéria-prima utilizada. Sendo
3 assim, quando não há padronização do leite, nem das etapas de processamento, pode
4 ocorrer à descaracterização do queijo de Coalho, alterando os seus parâmetros físico-
5 químicos. Além disso, características físico-químicas da matéria prima são importantes
6 para a determinação do valor nutritivo, do processamento industrial e da remuneração
7 do produtor (REIS *et al.*, 2007). E a redução dos valores de parâmetros físico-químicos
8 compromete diretamente o rendimento industrial, principalmente em relação à
9 fabricação de queijos, chegando a uma queda de 5% na produção, além de prolongar o
10 tempo de coagulação, firmeza do coágulo, expulsão do soro e taxa de desenvolvimento
11 da acidez (MUNRO *et al.*, 1984).

12 Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a contagem de células
13 somáticas e o perfil físico-químico do leite, utilizado como matéria-prima, e do queijo
14 de Coalho Artesanal produzido na Região Agreste do Estado de Pernambuco.

15

16 **MATERIAIS E MÉTODOS**

17 Os queijos de Coalho artesanais foram coletados em unidades fabris com selo da
18 Adagro-PE (Agência de defesa e fiscalização agropecuária de Pernambuco), prontos
19 para a comercialização nos meses de março e julho de 2008, nos seguintes municípios:
20 Venturosa, Correntes, Capoeiras, Arcoverde, e em duas unidades sem registro situadas
21 em São Bento do Una e Cachoeirinha, todos localizados na região Agreste de
22 Pernambuco, sendo acondicionados em caixas isotérmicas e imediatamente
23 transportados para o LIKA-UFPE (Laboratório de Imunopatologia Keizo- Asami –
24 UFPE), onde foram mantidas a 10 °C, até o momento das análises.

1 O processo de fabricação do queijo de Coalho foi realizado de acordo com o
2 fluxograma apresentado na Figura 1, seguindo uma tradição artesanal própria da região.

3 As amostras de leite utilizadas como matéria-prima para fabricar os queijos
4 foram analisadas no Laboratório da Rede Nacional de Controle e Qualidade do Leite,
5 localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de
6 Pernambuco – Brasil. Os parâmetros analisados foram: extrato seco total (%), proteínas
7 totais (%), gordura total (%), lactose (%) e contagem de células somáticas (CCS)
8 (x1000). As análises de proteína e gordura foram determinadas por leitura de absorção
9 infravermelha no equipamento Bentley2000 ® e a CCS por citometria de fluxo no
10 Somacount300®.

11 As amostras de queijo utilizadas foram analisadas quanto a parâmetros físico-
12 químicos de acordo com a Instrução Normativa n° 68 de 12/12/2006 – MAPA
13 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Os parâmetros analisados foram:
14 sólidos totais (%), proteínas totais (%), gordura total (%) e Lactose (%).

16 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

17 A média dos resultados obtidos para a matéria prima utilizada para fazer os
18 queijos neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Os percentuais de gordura
19 encontrados para os municípios de Arcoverde: (3,37%), Cachoeirinha: (3,24%),
20 Correntes: (4,0%), São Bento do Una: (3,35%) e Venturosa: (3,71%) estavam dentro do
21 recomendando pela Instrução Normativa n°51 (BRASIL, 2002), ou seja, acima do
22 mínimo de 3%. Entretanto, para o município de Capoeiras foi encontrada o valor abaixo
23 do estabelecido (2,75%). Alguns autores citam valores similares ao encontrados neste
24 trabalho, tais como LIMA *et al.* (2006) quando estudaram contagem de células
25 somáticas, análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo C produzido na

1 Região Agreste do Estado de Pernambuco obtendo valores de gordura entre 3,34% a
2 3,56%; RIBAS *et al.* (2004) quando estudaram sólidos totais do leite em amostras de
3 tanque nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, encontraram valores médios
4 de 3,69%.

5 Ao analisar os coeficientes de variação (CV) para o teor de gordura podemos
6 observar um valor médio de 18,68%, entre os municípios estudados. Esse resultado
7 corrobora com os encontrados por REIS *et al.* (2007), que estudaram a composição
8 físico-química em leite cru no município de Pedro Leopoldo e encontraram um
9 coeficiente de variação de 15,04%. De acordo com a literatura consultada, os
10 percentuais de gordura do leite variam segundo diversos fatores, tais como:
11 individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiental,
12 estação do ano, fatores fisiológicos (gestação, ciclo estral,), patológicos (mastite),
13 persistência de lactação, tamanho da vaca, quartos mamários, porção da ordenha e
14 intervalo entre ordenhas, espécie (COSTA *et al.*, 1992; WEISS *et al.*, 2002; REIS *et al.*,
15 2007).

16 Os valores para as contagens das células somáticas (CCS) das amostras
17 analisadas apresentaram um mínimo de $9,2 \times 10^4$ células/mL e um máximo de $5,28 \times$
18 10^5 células/mL sendo considerados dentro do limite determinado pela Instrução
19 Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), que termina o máximo de CCS para a região
20 Nordeste seja de 1×10^6 células/mL até o ano de 2010. Resultados semelhantes foram
21 encontrados por LIMA *et al.* (2006), ao estudarem 13 produtores de leite da região
22 Agreste de Pernambuco, ou seja, atendiam ao padrão estabelecido pela Instrução
23 Normativa nº 51. Em relação à CCS, o coeficiente de variação foi de 54,31%, essa
24 variabilidade pode ter sido em decorrência do nível de higiene na ordenha, por se tratar
25 de 6 municípios diferentes com manejos dos rebanhos distintos.

1 A influência da concentração de células somáticas sobre os constituintes do leite
2 tem sido muito discutida por vários autores, tais como LIMA *et al.* (2006); RANGEL *et*
3 *al.* (2009) e RIBAS *et al.* 2004. Todos esses autores encontraram uma correlação
4 positiva entre CCS e teor de gordura, similar ao presente estudo. Entretanto, o estudo
5 realizado por PICININ (2003), em 31 propriedades leiteiras na Região Metropolitana de
6 Belo Horizonte, demonstrou que quanto maior a CCS, menores os teores de gordura e
7 extrato seco total (EST) do leite.

8 Entre as coletas realizadas neste estudo houve uniformidade nos valores obtidos
9 para proteína nos municípios estudados: Arcoverde: 3,19%; Cachoeirinha: 2,99%;
10 Capoeiras: 3,00%; Correntes: 3,13%; São Bento do Una: 2,90% e Venturosa: 3,48%,
11 todos os valores estavam dentro do limite de no mínimo 2,9% estabelecido pela
12 Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002). Esses resultados são semelhantes àqueles
13 determinados por LIMA *et al.* (2006), que encontraram valores entre 3,06% e 3,12%;
14 REIS *et al.* (2007), quando avaliaram a influência dos procedimentos de coleta do leite
15 cru obtiveram resultados entre 2,91% e 3,03% similares aos encontrados neste trabalho,
16 e RIBAS *et al.* (2004), determinaram a concentração média de proteínas de 3,24%.
17 MACHADO *et al.* (2000), avaliando a composição do leite de tanques de rebanhos
18 brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas, mostraram valores
19 médios para proteínas de 3,20%.

20 Quanto aos teores de lactose, a legislação não preconiza nenhum padrão, nesse
21 caso os valores observados neste estudo foram para: Arcoverde: 4,45%; Cachoeirinha:
22 4,55%; Capoeiras: 4,27; Correntes: 4,33; São Bento do Una: 4,26 e Venturosa: 4,61,
23 estão dentro dos encontrados por outros autores, como LIMA *et al.* (2006) estudando o
24 leite produzido por 13 propriedades rurais no Agreste de Pernambuco, encontraram
25 valores de 4,45% a 4,48%; RIBAS *et al.* (2004), determinaram a concentração média

1 de lactose de 4,55%; MACHADO *et al.* (2000), mostraram valores médios de 4,51% e
2 PRADA *et al.* (2000) analisando o efeito do nível de células somáticas sobre os
3 constituintes do leite, encontraram uma média de 4,61%.

4 O acompanhamento da matéria prima é importante para garantir uma qualidade
5 do produto fabricado a partir dela, principalmente em produtos artesanais. Sendo assim,
6 os resultados obtidos para a análise da qualidade físico-química do queijo de Coalho
7 produzido com leite cru estão apresentados na Tabela 2.

8 Em relação ao teor de umidade, os queijos avaliados foram classificados de
9 acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos (BRASIL,
10 1996), como sendo de alta a muito alta umidade, variando dentre 52,76% para o queijo
11 do Município de Venturosa até 58,37% para São Bento do Una. Essa diferença foi
12 provavelmente devido à falta de uniformidade no fluxograma de produção, como por
13 exemplo, a padronização do tempo de prensagem ideal, o que justificaria esse aumento
14 de umidade entre os municípios estudados, como descrito por NASSU *et al.* (2001).
15 Diante deste fato é extremamente importante a manutenção de todo o processamento de
16 forma rigorosa, pois uma elevação no teor de umidade interfere na atividade de água
17 (W_a) e nas ações metabólicas de microorganismos, com suas possíveis consequências no
18 pH, na textura, no sabor e no aroma (FERREIRA; FREITAS FILHO, 2008), além de
19 facilitar a proliferação de bactéria diminuindo o tempo de prateleira do produto.

20 A classificação obtida no presente estudo, foi similar àquela encontrada por
21 SENA *et al.* (2000) quando estudaram queijos de Coalho produzidos no Estado de
22 Pernambuco, classificando-os como sendo de média a alta umidade, de acordo com a
23 legislação vigente. Entretanto, FERREIRA; FREITAS FILHO (2008) encontrou para o
24 queijo de Coalho artesanal produzido no município de Barreiros-PE, uma umidade entre
25 32 a 41%, considerando um queijo de baixa a média umidade, diferindo dos resultados

1 encontrados neste trabalho. Essa diferença observada pode ser novamente explicada
2 pela falta de padronização no fluxograma de produção.

3 Quanto ao teor de proteína, a legislação não estabelece padrão, tendo sido
4 encontrado neste estudo uma variação de 17,04% para o município de Arcoverde a
5 21,59% para o município de Correntes. Os resultados encontrados no presente estudo
6 foram diferentes dos relatados por NASSU *et al.* (2001) que encontraram valores
7 médios para proteína de 24,26%, quando estudaram queijo de Coalho produzidos no
8 Estado do Ceará, e NASSU *et al.* (2003) nas análises físico-químicas de queijo de
9 coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte encontraram valores médios de
10 24,87% para as proteínas do queijo. Essas diferenças observadas podem ser atribuídas a
11 falta de padronização do fluxograma de produção como sugerido por SENA *et al.*
12 (2000) quando estudaram a composição físico-química de amostras de queijo de Coalho
13 comercializados em Recife – PE, observaram diferenças nestes parâmetros.

14 Os valores encontrados neste trabalho para gordura ficaram entre 21,25% para o
15 queijo do Município de Capoeiras e 29,9% para o queijo do Município de Correntes,
16 desta forma, podemos classificá-los como magro a semi-gordo, isto de acordo com o
17 regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos (BRASIL, 1996). NASSU *et*
18 *al.* (2003) quando estudaram o queijo de Coalho fabricado no Ceará e Rio Grande do
19 Norte, encontraram os valores para os teores de gordura entre 25,61 e 27,32%,
20 respectivamente. Esses resultados foram diferentes dos obtidos no nosso estudo, sendo
21 provavelmente devido à matéria-prima utilizada, que pode ser influenciada pelo tipo de
22 animal, pela alimentação e manejo do rebanho, e o fluxograma de produção, pois a
23 formação e o manuseio da coalhada afetam a sua habilidade de reter gordura e umidade,
24 influenciando a composição centesimal do produto final (NASSU *et al.* 2001).

25

1 **CONCLUSÃO**

2 Nas amostras de leite e queijo de Coalho produzido nos municípios analisados
3 da região Agreste do Estado de Pernambuco, em sua maioria, os parâmetros analisados
4 estão dentro dos padrões exigidos pela Instrução Normativa nº 51, e para os parâmetros
5 que não são regulamentados pela legislação os resultados encontrados se aproximam dos
6 citados na literatura. O queijo de Coalho artesanal produzido na região Agreste de
7 Pernambuco necessita de padronização para a fixação de um fluxograma que possa ser
8 utilizado em várias regiões diminuindo a variação existente entre os vários locais
9 produtores de queijo.

10

11

12 **AGRADECIMENTOS**

13 Agradecemos FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado
14 de Pernambuco), UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco), LIKA
15 (Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami), aos Laticínios produtores de queijo de
16 Coalho dos municípios estudados da Região Agreste do Estado de Pernambuco.

17

18

19

20

21

22

23

24

25 **REFERÊNCIAS**

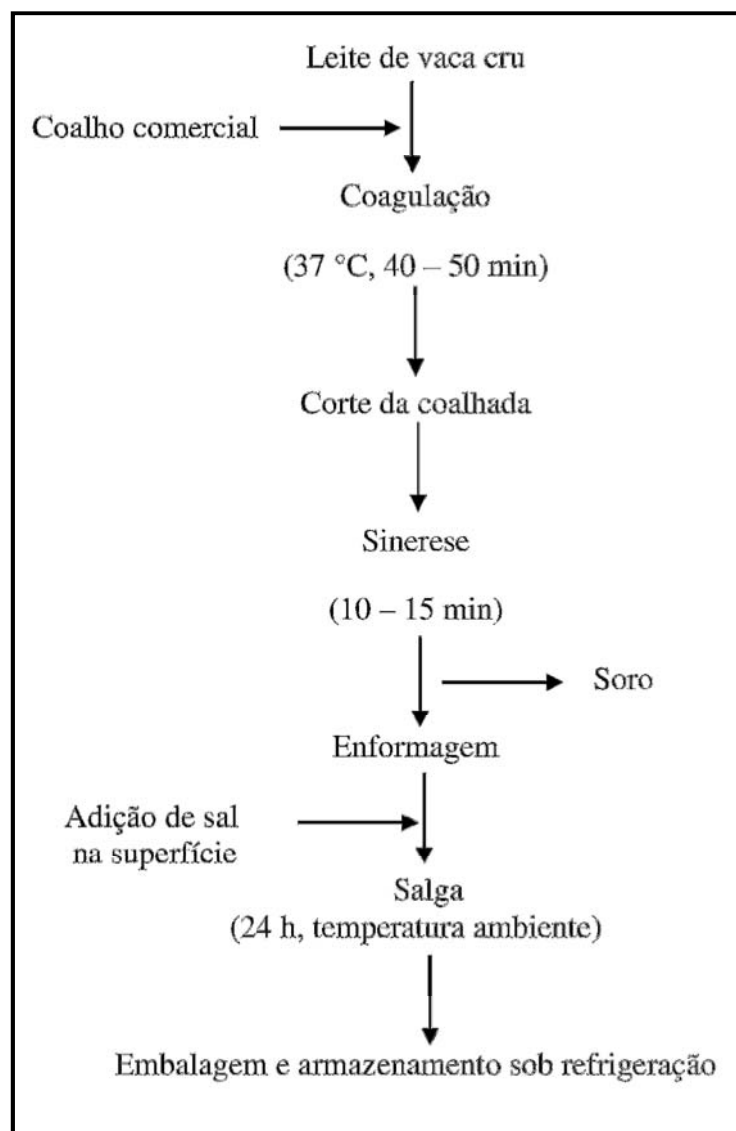
- 1 ALMEIDA, S.L. et al. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva
2 da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. *RIAE - Revista*
3 *Ibero-Americana de Estratégia*, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 74-97, mai./ago. 2010.
4 Disponível em: <<http://www.revistaiberoamericana.org/index.php/ibero/index>>. Acesso
5 em: 12 mai. 2011.
- 6 ALMEIDA, S.L. et al. Identidade cultural e desenvolvimento territorial: um olhar sobre
7 as iniciativas para certificação de origem do queijo coalho em Pernambuco. In S. M. B.
8 Aguiar (Org.), *Gestão pública: práticas e desafios* (pp. 373-397). Recife: Bagaço, 2009.
- 9 BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Regulamento
10 técnico de identidade e qualidade de queijos. *Diário Oficial da República Federativa do*
11 *Brasil*, Brasília, 11/03/1996. p. 3977-3978.
- 12 BRASIL. Instrução Normativa nº51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os
13 regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... *Diário Oficial*
14 *da União*, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.
- 15 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
16 Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais
17 Físico-químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*,
18 Brasília, DF, seção 1, p.8, 2006.
- 19 RIBAS, N. et al. Sólidos Totais do Leite em Amostras de Tanque nos Estados do
20 Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.2343-
21 2350, 2004. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbz/v33n6s3/23437.pdf>. Acesso em:
22 12 mai, 2011. doi: 10.1590/S1516-35982004000900021.
- 23 COSTA, F.M.A. et al. Variação do teor de gordura no leite bovino cru. *Pesquisa*
24 *Agropecuária Brasileira*, v.27, n.5, p.763-769, 1992. Disponível em: < <http://>

- 1 webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab1992/maio/pab14_maio_92.pdf >. Acesso em 12 mai.
2 2011.
- 3 FERREIRA, W.; FREITAS FILHO, JR. Avaliação da qualidade físico-químicos do
4 queijo coalho comercializado no Município de Barreiros-PE. *Revista Brasileira de*
5 *Tecnologia Agroindustrial*. Paraná, v. 02, n. 01: p. 127-133, 2008. Disponível em:
6 <http://www.pg.utfpr.edu.br/depog/periodicos/index.php/rbta/article/viewFile/277/245>>.
7 Acesso em: 13 maio. 2011.
- 8 LIMA, M.C.G. et al. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e
9 microbiológicas do leite cru tipo c produzido na região agreste do estado de
10 Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.73, n.1, p.89-95, jan./mar.,
11 2006. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_1/lima.PDF>.
12 Acesso em: 13 maio. 2011.
- 13 MACHADO, P. F., et al. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros
14 distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de*
15 *Zootecnia*. v. 29. n.6. p. 1883-1886, 2000. Disponível em: <[www.scielo.br/pdf](http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n6/5721.pdf)
16 [/rbz/v29n6/5721.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n6/5721.pdf)>. Acesso em 13 mai. 2011.
- 17 MUNK, A.V. Queijo de coalho: princípios básicos da fabricação. *Revista do Instituto de*
18 *Laticínio Cândido Tostes*, v. 59, n. 339, p. 13-15, 2004.
- 19 MUNRO, G. L., et al. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing
20 properties and yield and quality of milk products. *The Australian Journal of Dairy*
21 *Technology*, v. 39, n. 1, p. 7 -16, 1984. Disponível em: < [http://www.diaa.asn.au/index.](http://www.diaa.asn.au/index.php)
22 [php](http://www.diaa.asn.au/index.php)>. Acesso em: 12 mai. 2011.
- 23 NASSU, R.T. *Diagnóstico das condições de processamento e Caracterização Físico*
24 *química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte*. Fortaleza, CE:

- 1 Embrapa Agroindústria Tropical, 2003, 24p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento,
2 11).
- 3 NASSU, R.T. *Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais*
4 *derivados do leite no Estado do Ceará*. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical,
5 2001, 28p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 1).
- 6 PICININ, L.C.A. et al. Qualidade físico-química de leite cru resfriado. In:
7 CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG. Anais.
8 Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2001. V.56, 389p. p.294- 300.
- 9 PICININ, L.C. *A Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de*
10 *Minas Gerais*: 2003. 89f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Minas Gerais, Belo
11 Horizonte.
- 12 PRADA, L.F.S. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite
13 II – lactose e sólidos totais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal*
14 *Science*, v..37 n.4, São Paulo, 2000. Disponível em: < <http://www.scielo.br/scielo.php>>.
15 Acesso em: 13 mai. 2011. doi: 10.1590/S1413-95962000000400014.
- 16 REIS, G.L. et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a
17 composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Ciência Rural*, Santa
18 Maria, v.37, n.4, p.1134-1138, jul-ago, 2007. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/cr/v37n4/a35v37n4.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2011. doi: 10.1590/S0103-
19 84782007000400035
- 20
- 21 RANGEL, A.H.N. et al. Correlação entre a contagem de células somáticas (CCS) e o
22 teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. *Revista Verde*
23 (Mossoró – RN – Brasil) v.4, n.3, p. 57-60 julho/setembro de 2009. Disponível em:
24 <www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/197/197>. Acesso em: 13
25 mai. 2011.

1 SENA, M.J et al. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em
2 Recife, PE. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.14, n.74, p.41-44, jul. 2000. Disponível
3 em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>>. Acesso em:13 mai. 2011.
4 WEISS, D. et al. Variable milking intervals and milk composition. *Milchwissenschaft*,
5 v.57, n.5, p. 246-249, 2002. Disponível em: < [http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN](http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13648329)
6 &cpsidt=13648329. Acesso em: 12 mai. 2011.

7
8 .
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25



21 **Figura 1.** Fluxograma de produção do queijo de Coalho produzido pelos
22 Municípios estudados da Região Agreste do Estado de Pernambuco.

23

24

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Tabela 1. Análises físico-químicas e contagem de células somáticas do leite utilizado como matéria-prima para fabricação dos queijos de Coalho artesanais provenientes dos municípios estudados na Região Agreste de Pernambuco.

Amostra	Proteína (%)	Gordura (%)	EST (%)	Lactose (%)	CCS x 1000
Arcoverde	*3,19 ± 0,18 **5,76	3,37 ± 0,23 6,91	11,88 ± 0,20 1,67	4,45 ± 0,15 3,33	326,15 ± 117,6 36,00
Cachoeirinha	*2,99 ± 0,27 **9,2	3,24 ± 0,64 19,64	11,66 ± 0,76 6,55	4,55 ± 0,04 0,93	92,15 ± 28,5 30,92
Capoeiras	*3,00 ± 0,15 **4,94	2,75 ± 0,79 28,80	10,79 ± 0,71 6,55	4,27 ± 0,14 3,31	426,85 ± 308 72,17
Correntes	*3,13 ± 0,19 **6,09	4,0 ± 0,67 16,77	12,12 ± 0,56 4,67	4,33 ± 0,05 1,31	528,35 ± 239,5 45,32
São Bento do Una	*2,9 ± 0,29 **9,98	3,35 ± 0,68 20,44	11,56 ± 0,64 5,56	4,26 ± 0,04 0,99	491,15 ± 406 82,68
Venturosa	*3,48 ± 0,23 **6,69	3,71 ± 0,71 19,22	12,49 ± 0,66 5,32	4,61 ± 0,07 1,53	416 ± 244,65 58,81
Total	***7,11	18,68	5,05	1,90	54,31

Legenda: EST (extrato seco total); CCS (contagem de células somáticas); *Média aritmética das coletas +\- desvio padrão; **Coeficiente de variação; *** Coeficiente de variação médio.

Tabela 2. Análises físico-químicas dos queijos de Coalho provenientes dos municípios estudados na Região Agreste de Pernambuco.

Amostra	Umidade (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lípido (g/100 g)	Lactose (g/100 g)
Arcoverde	*54,16 ± 0,87 **1,60	17,04 ± 0,49 2,90	27,00 ± 4,95 18,33	3,54 ± 0,05 1,40
Cachoeirinha	*53,65 ± 0,39 **0,72	18,87 ± 1,50 7,9	23,5 ± 1,41 6,00	4,45 ± 0,05 1,11
Capoeiras	*57,13 ± 0,64 **1,11	19,10 ± 2,18 11,44	21,25 ± 0,35 1,66	3,75 ± 0,06 1,5
Correntes	*52,76 ± 0,96 **1,82	21,59 ± 1,40 6,48	29,9 ± 2,69 8,99	4,42 ± 0,04 0,96
São Bento do Una	*58,37 ± 1,65 **2,8	17,6 ± 2,25 12,78	23,00 ± 1,41 6,15	5,01 ± 0,01 0,28
Venturosa	*54,5 ± 1,48 **2,72	17,20 ± 0,58 3,4	25,25 ± 5,30 21,00	5,20 ± 0,03 0,54
Total	***1,79	7,48	10,35	0,96

Legenda: *Média aritmética das coletas +\- desvio padrão;**Coeficiente de variação;
*** Coeficiente de variação médio.

CAPÍTULO III

Artigo Submetido à Revista:



1 **Proteolysis Characterization in Artisanal “Coalho” Cheese from Semi-Arid**
2 **(Agreste) of Pernambuco State-Brazil: by using SDS-PAGE and MALDI-ToF**

3

4 Roberto Afonso da Silva ^{2,3}, Vilma Sobral Bezerra ^{2,3}, Maria do Carmo de Barros
5 Pimentel ^{1,2}, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^{2,3}, Maria Taciana Holanda Cavalcanti ^{2,3}, José
6 Luiz de Lima Filho*^{1,2}

7

8 ¹ Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof.
9 Moraes Rego,1235, Cidade Universitária, 50670-901- Recife, Pernambuco - Brazil.

10

11 ² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de
12 Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50780-901 -
13 Recife, Pernambuco - Brazil.

14

15 ³ LABTECBIO/ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal
16 Rural de Pernambuco-UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-
17 900 - Recife, Pernambuco - Brazil.

18

19

20 *Author for correspondence: José Luiz de Lima Filho, joseluz60@mac.com

21

Tel.: 55 81 2126 8484; fax 55 81 2126 8485

22

23

24

25

26 Abstract

27 Cheese samples from six towns of the Semi-arid (Agreste) region of Pernambuco State-
28 Brazil were evaluated in relation to protein and peptide profiles using electrophoresis
29 SDS-PAGE and MALDI/ToF-MS. Mass spectra of cheeses were composed of a
30 number of different peaks, thus indicating an intense and complex proteolysis. The
31 experimental procedures confirmed a total of 32 peptides (11 from α_{S1} -Casein, 3 from
32 α_{S2} -Casein, 15 from β -casein and 3 from κ -casein), from these, 7 were
33 caseinphosphopeptides. It also was detected proteins: lactoferrin, β -lactoglobulin, β -
34 lactoglobulin (dimer), α -lactoglobulin, soroalbumin, α -casein, β -casein, κ -casein and
35 para- κ -casein. Among non-identified peptides, three of them showed peak at high
36 intensity in all “Coalho” cheese studied, with a molecular weight of 1597, 1725/1726,
37 2778/2779 Da, suggesting that these peptides may be a possible molecular marker for
38 the Coalho” cheese “of Agreste Pernambuco State-Brazil. According to the literature,
39 some peptides identified can have the following bioactivities: antihypertensive, mineral-
40 binding, immunomodulatory, antimicrobial and antioxidant.

41 **Keywords:** MALDI/ToF-MS, casein, bioactive peptides, Artisanal “Coalho” cheese,
42 cheese.

43

44

45

46

47

48

49

50

51 1. Introduction

52

53 The artisanal “Coalho” cheese is a product typically popular from northeastern,
54 largely consumed by local population. In Pernambuco State, this cheese is one of the
55 main products manufactured in the Agreste Region acquiring great importance in the
56 economy of small towns, since it constitutes the main source of family income
57 improving the familiar agriculture of the northeastern region. This cheese is
58 characterized by being high in moisture content, having mild acidic flavor, softness and
59 creamy texture and short shelf-life, it is generally an unripened cheese. Generally made
60 by farmers on a small scale using raw or pasteurized milk and traditional cheese made
61 techniques, although very poor knowledge about cheese technology and composition
62 (Cavalcante et al., 2007).

63 Cow's milk used as raw material for cheese production, is the most important
64 regional product under industrial and commercial standpoints. It is composed of water
65 (87.3%) and total solids (12.7%), as follows: total protein from 3.3 to 3.5%; fat from 3.5
66 to 3.8%; lactose 4.9%; minerals 0.7% and very few vitamins. Milk proteins can be
67 classified into four groups according to their physico-chemical and structural properties:
68 a) casein, b) whey protein c) proteins from the membranes of fat globules, d) enzymes
69 and growth factors (Sgarbieri, 2005).

70 Casein content from ruminant milk represents approximately 80% of milk
71 proteins (Feligini, Bonizzi, Buffoni, Cosenza, & Ramunno, 2009). The casein fractions
72 are phosphoproteins which, in their natural form, appear as colloidal particles (micelles)
73 formed by α (50%), β (33%), γ (2%) casein in the core, and κ -casein (15%) that is
74 distributed partly in the mass and on micelle surface, being responsible for the physico-
75 chemical stability of the micelle. The casein structural units (submicelles) are held

76 together by colloidal calcium phosphate. In addition, α -caseins are a family of proteins
77 with different characteristics (α_{s0} a α_{s5}). The proportions of the various casein fractions in
78 the micelle structure are 3:1:3:1 for α_{s1} , α_{s2} , β and κ casein, respectively, and each
79 group of casein, still appear genetic variants (Sgarbieri, 2005; Silva & Malcata, 2005).

80 During cheese manufacturing, chymosin (principal protease used to produce
81 many cheeses) is added to cleave Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bound of κ -casein. The protein
82 hydrolysis leads to destabilization of all casein micelles, which aggregate is the cheese
83 curd. Curd is a continuous casein/mineral matrix in which fat and water are embedded
84 (Lawrence, Creamer, & Gilles, 1987). The α_s -casein (α_s -CN) and β -casein (β -CN)
85 constitute the basic microstructure of cheese, thus casein forms are the largest protein
86 component in milk of industrial significance (Horne, 2006), which are fundamental to
87 the production and characteristics of products, including yogurt, cheese, infant
88 formulas, juices and others diary (Miquel et al., 2006).

89 Proteolysis is the most and major complex biochemical process that takes place
90 during the production and ripening of most cheese varieties (Pappa et al., 2008). This
91 proteolysis process changes texture, especially elasticity, brittleness, adhesiveness,
92 hardness and chewiness properties. The same process is responsible for the
93 development of basic tastes and changes in cheese flavor, due to the production of
94 ammonia, amines, sulphur compounds and volatile free fatty acids produced during this
95 process (Ferrandini, López, Castillo, & Laencina, 2011). The phenomenon of primary
96 proteolysis of cheese involves the formation of high-molecular-weight peptides, which
97 are insoluble in water, and a range of intermediate-sized and small peptides water-
98 soluble; free amino acids and their degradation products. As regards to the primary
99 proteolysis, the type of rennet used plays an important role. Different types of rennet are
100 commercially available, which may differ in their origin (i.e., animal, vegetable,

101 microbial, or recombinant rennet) or physical state (liquid, powder or paste) (Ferrandini,
102 López, Castillo, & Laencina, 2011). The proteolytic enzymes employed in the different
103 stages of cheese processing determine the characteristics of the casein residues. Active
104 indigenous proteolytic agents include enzymes (plasmin), rennet (chymosin and pepsin)
105 or the enzymes released by starter and non-starter microorganisms (Hayaloglu,
106 Brechany, Deegan, & McSweeney, 2008).

107 Proteomics has emerged as a novel experimental approach to characterize the
108 origin and evolution of foodstuffs, in part because recent innovations in mass
109 spectrometry (MS) have simplified protein analysis and characterization (Pappa et al,
110 2008). Proteomics techniques are potentially appropriate for identifying peptides and
111 characterizing the extent and nature of cheese proteolysis (Piraino et al., 2007) as well
112 as for monitoring the authenticity of cheeses from different sources of milk. MALDI-
113 ToF (matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry) is a
114 well-established mass spectrometry technique which has proved then abilities for
115 identifying proteins, peptides and some other ionizable compounds in the samples. In
116 the later years, also quantitative use of MALDI-ToF has gained ground, but mostly still
117 from comparing selected peaks and internal standards (Liland, Mevik, Rukke, Almøy,
118 & Isaksson, 2009). Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–
119 PAGE) has been used widely to study casein hydrolysis and the type of proteolysis in
120 cheeses, because of its high resolution and capability of quantitative results (Park & Jin,
121 1998).

122 Therefore, the aim of the present study was to determine the protein, peptide
123 profiles and evaluate manufacturing proteolysis of artisanal “Coalho” cheese produced
124 in the Agreste region of Pernambuco-Brazil, by electrophoresis SDS-PAGE and
125 MALDI/ToF-MS, suggesting the possible bioactivity of these peptides.

126 2. Materials and Methods

127

128 2.1. Materials

129

130 Samples of artisanal “Coalho” cheeses were collected, directly with producers
131 after its manufacturing, in the following towns of Agreste of Pernambuco State-Brazil:
132 Arcoverde (ARC), Capoeiras (CAP), Cachoeirinha (CAC), Correntes (COR), São Bento
133 do Una (SBU) and Venturosa (VEN). Samples were collected in sterile plastic bags,
134 identified and immediately transported to the laboratory kept at 10 °C until the time of
135 analysis. The production process of artisanal “Coalho” cheese was performed according
136 to the flowchart shown in the Fig. 1. It was used animal industrial rennet (Chymosin) to
137 obtain the initial curd for cheeses. All chemicals were of analytical grade.

138

139 INSERT FIGURE 1 HERE

140

141 2.2. Preparation of cheese extracts

142

143 Each cheese sample was homogenized with water (1:2 w/v) at 1000 rpm for 5
144 min in a Nissei AM-8 Homogenizer. The homogenate was centrifuged three times at
145 8.000 xg for 30 min at 4 °C, the precipitate was discarded and the final supernatant
146 (water soluble peptides - WSP) was freeze-dried and stored at – 20 °C.

147

148

149

150

151 2.3. *Protein determination*

152

153 Protein concentration was measured according to Lowry, Rosebrough, Farr, and
154 Randall (1951) using bovine serum albumin as standard.

155

156 2.4. *SDS-PAGE electrophoresis*

157

158 Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was
159 carried out for the protein profile determination of the “Coalho” cheese as described by
160 Laemmli (1970). Stacking gel was prepared with 4.0 % (w/v) polyacrylamide, 0.8 %
161 (w/v) N,N'-methylene-bis(acrylamide), and 10 % (w/v) SDS and the separating gel was
162 prepared with 15 % (w/v) polyacrylamide, 0.6 % (w/v) N,N'-methylene-bis(acrylamide)
163 and 10% SDS. The freezer-dried aliquots of WSP were diluted in sample buffer (0.5 M
164 Tris-HCl pH 6.8, 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) glycerol, 5 % (v/v) β -mercaptoethanol
165 and 2 % (w/v) bromophenol blue). Samples were heated in water bath at 100 °C for 3
166 min before electrophoresis. Then, 15 μ L of each sample were applied on the gel surface
167 and fractionated for 2 h, starting in constant current at 25 mA. Gels were stained with
168 0.25 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 25 % methanol – 10 % acetic acid and the
169 excess of dye was removed with 25 % methanol – 10 % acetic acid mixture or the gel
170 was submitted to silver staining. The molecular weight of the proteins was estimated
171 using a molecular weight calibration kit as markers (Bio-Rad): phosphorylase b (97,400
172 Da), bovine serum albumin (66,200 Da), egg white ovalbumin (45,000 Da), carbonic
173 anhydrase (31,000 Da), trypsin inhibitor (21,500 Da) and lisozin (14,400 Da).

174

175

176 2.5. *Mass Spectrometry (MALDI-ToF)*

177

178 2.5.1. *WSP Sample Preparation in ZipTip C18 Colum*

179 The activation of ZipTip C18 column was done by rinsing (3 times) with 10 μ L
180 of wetting solution (acetonitrile 100 %), followed the column was equilibrated (3 times)
181 with 10 μ L of equilibration solution (0.1 % trifluoroacetic acid in Milli-Q grade water).
182 Sample of WSP was aspirated into the column and dispensed from the column during
183 10 cycles. After this procedure, the column containing absorbed peptides was washed
184 using 10 μ L of wash solution (0.1 % trifluoroacetic acid) aspirating and dispensing at
185 least once. The peptides were eluted with 10 μ L of elution solution (50 % acetonitrile
186 containing 0.1 % trifluoroacetic acid). Carefully, aspirate and dispense eluent through
187 Zip Tip at least three times.

188

189 2.5.2. *MALDI-ToF analysis of the WSP*

190

191 This study was carried out in system Ettan MALDI-ToF-Pro (Amersham
192 Biosciences) equipped with a quadratic reflectron field and timed ion gate. The
193 acquisition of intact peptides was performed in linear mode with positive ionization,
194 rejection of mass 500 m/z, velocity of 8 shots/sec, the ion accelerating potential of 20
195 kV, 256 shots were collected for each spectrum. The soluble peptides eluted from Zip
196 Tip column were mixed with 150 μ L of 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid, followed 1 μ L
197 from this mixture was added with matrix solution 4-HCCA (α -cyano-4-hydroxy-
198 cinnamic acid in 50 % v/v acetonitrile containing 0.1 % v/v trifluoroacetic acid) in the
199 proportion of 1:1. Then, aliquot of 0.3 μ L were applied in each four different spots on a
200 sample slide tray and allowed to dry at room temperature (23-25 $^{\circ}$ C). The slide was

201 inserted into the mass spectrometer to obtain spectra. Calibration of the time-to-mass
202 scale was performed using two external standard peptides (ile7AngIII, Bradicinyn M+H
203 897.531, monoisotopic, and hACTH 18-39, M+H 2465.191, monoisotopic). The graphs
204 were plotted on the Ettan MALDI-ToF software Pro version 2.0 of the device itself.
205 Then the results were exported to be plotted on the software mMass - Open Source
206 Mass Spectrometry Tool (Strohalm, Kavan, Novák, Volný, & Havlíček, 2010).

207

208 **3. Results and Discussion**

209

210 *3.1. Protein profile by SDS-PAGE electrophoresis of the “Coalho” cheese*

211

212 According to Fig. 2, it was observed that the protein profile for “Coalho” cheese
213 showed bands between 97,400 and 14,000 Da and others one above 97,400 and below
214 14,000 kDa.

215

216 INSERT FIGURE 2 HERE

217

218 Five proteins from non-casein fraction were detected in all “Coalho” cheese
219 samples, which are part from bovine milk protein that is used as raw material in the
220 manufacture of these cheeses. It was characterized the presence of lactoferrin (~80,000
221 Da) that according to (Farnaud & Evans, 2003) is an iron-binding glycoprotein of the
222 transferrin family, found in milk of various mammals. It is great importance because
223 lactoferrin has a broad antimicrobial spectrum against many Gram-positive and Gram-
224 negative bacteria (Pan et al., 2007). It was also reported that charge modification of
225 plasma and milk proteins resulted in antiviral compounds (Swart et al., 1999). Besides

226 its effect on microbial and antiviral growth, lactoferrin is known to possess a diverse
227 range of biological properties, including immuno-modulating, anti-inflammatory and
228 acts as a growth factor and maturation of enterocytes (Farnaud & Evans, 2003; Legrand,
229 Ellass, Pierce, & Mazurier, 2004; McIntosh et al., 1998). Furthermore, Van Belzen
230 (2002) pointed out that lactoferrin probably decreased the risk of cancer. According to
231 Dupont et al. (2006) studying about lactoferrin concentration in soft, semi-hard and
232 Swiss-type cheeses showed that the presence depends on the cheese-making process,
233 with higher values in Swiss-type and semi-hard cheeses than in soft cheese. In addition,
234 this protein stayed intact throughout ripening in raw milk cheese, whereas it was
235 partially hydrolyzed in cheeses made with pasteurized milk. Based on these
236 observations, artisanal “Coalho” cheese may constitute a natural dairy source of
237 lactoferrin beneficial to health.

238 β -lactoglobulin (β -LG) (~18,000 Da) and its dimer (~36,000 Da) also are
239 proteins displayed in the electrophoresis gel which constitute approximately 50% of the
240 proteins present in whey. Native β -LG, a small globular protein with defined secondary
241 and tertiary structures, is widely used as a food ingredient because of its nutritional
242 value and ability to form gels (Lefèvre & Subirade, 2000). Studies have shown that β -
243 LG can bind hydrophobic ligands like retinol, retinoic acid, long-chain fatty acids and
244 aromatic compounds. The retinol-binding site is inside the β -barrel, in the central cavity
245 (Narayan & Berliner, 1997), also known as calyx (Brownlow et al., 1997; Flower,
246 North, & Attwood, 1993). Also, its peculiar biochemical properties can make it display
247 as an oral drug carrier (McAlpine & Sawyer, 1990). The α -lactoglobulin (~14,000 Da),
248 in quantitative terms, is the second serum peptide (15%-25%) from cow's milk,
249 characterized for being easy and fast digested. It contains the highest level of tryptophan
250 (6%) among all food proteins (Markus, Olivier, & De Haan, 2002). One of the

251 important fact is that the α -lactoglobulin is a precursor of the biosynthesis of lactose in
252 breast tissue and has the ability to mineral-binding, such as calcium and zinc, which
253 may positively affect its absorption, moreover the α -lactoglobulin fraction has
254 antimicrobial activity against pathogenic bacteria, such as, *Escherichia coli*,
255 *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (Lönnerdal, 2003).

256 Also it was found the serum albumin bovine (BSA) (~66,000 Da), which
257 corresponds to about 10% of the whey proteins, is rich in cystine (6%) and important
258 precursor of glutathione synthesis. It has affinity for free fatty acids and other lipids,
259 thus favoring its transport into the bloodstream (De Wit, 1998).

260 Beyond these proteins characterized from the “Coalho” cheese analysis, it still
261 was possible to observe the native caseins: α -casein (~23,000 Da), β -casein (~24,000
262 Da), κ -casein (~19,000 Da) and para- κ -casein (~11,500 Da), where the last one is
263 product from κ -casein due to hydrolytic activity of chymosin in the Fen₁₀₅-Met₁₀₆ sites
264 during the primary proteolysis of milk clotting. The others no characterized bands,
265 according to literature, suggest that they can be products from hydrolysis of native
266 proteins in different cleavage sites or due to the presence of different proteins which
267 should be kept during the artisanal manufacture process of “Coalho” cheese. The large
268 amount of proteins and peptides contained in the “Coalho” cheese makes this cheese an
269 excellent nutritive and functional food.

270

271 3.2. Peptide profile of the artisanal cheese “Coalho” by mass spectrometry MALDI- 272 ToF

273 The mass spectra of water-soluble peptides (WSP) of different cheese samples
274 are shown in Fig. 3-5 (A-F).

275

276 INSERT FIGURE 3 HERE

277

278 INSERT FIGURE 4 HERE

279

280 INSERT FIGURE 5 HERE

281

282 The ratios of molecular mass to charge (m/z) of various peptides and the corresponding
283 relative intensities of different cheese samples are shown. Generally charge of ion (z)
284 was +1 and hence m/z can be compared to molecular mass (MW) of the peptides. Only
285 peptides with $m/z < 3500$ were monitored in this study which was produced during
286 proteolysis of cheese proteins. In order to understand the origin of the peptides, their
287 m/z values were compared to the reported molecular masses of peptides identified from
288 different cheeses cited by several authors. The peptides detected were derived from
289 fragmentation of the milk caseins (α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN e κ -CN). Table 1 shows the
290 molecular weight of species according to towns of the cheese factory and all of them
291 showed high casein proteolysis. For cheese from Arcoverde city, it was found a total of
292 67 peptides from which 26 are identified according to literature. However, cheese
293 “Coalho” from Capoeiras and Venturosa towns showed less peptides (57) with 24
294 already identified. The cheeses from Cachoeirinha, Correntes and São Bento do Una
295 cities showed about 70-71-72 peptides, being identified 24, 28 and 24, respectively.

296

297

298 INSERT TABLE 1 HERE

299

300

301 3.2.1. *Peptides from α -casein*

302

303 The “Coalho” cheese peptides identified as hydrolytic product from α -casein are
304 shown in Table 2. Fifteen peptides were identified with molecular weight between 805 a
305 2929 Da due to several specific cleavage sites. Nine of them, α_{S1} -CN (f24-32), α_{S1} -CN
306 (f24-36), α_{S1} -CN (f86-98), α_{S1} -CN (f1-14), α_{S1} -CN (f24-38), α_{S1} -CN (f1-18), α_{S1} -
307 CN41P (f73-91), α_{S2} -CN4P (f2-21) and α_{S2} -CN3P (f46-70) were found in all cheese
308 samples evaluated. One peptide, α_{S1} -CN (f29-35), was only found in cheese from
309 Venturosa and the α_{S1} -CN (f26-35) from Correntes towns while the α_{S2} -CN4P (f1-19)
310 was detected in the cheeses from Arcoverde, Capoeiras and Correntes and α_{S1} -CN (f1-
311 23) in the samples from Arcoverde and Correntes. Only the cheese from Venturosa
312 town did not show the α_{S1} -CN (f143-149) peptide.

313

314 INSERT TABLE 2 HERE

315

316 Chymosin catalyses the hydrolysis of α_{S1} -casein at Phe₂₃-Phe₂₄ linkage yielding
317 the peptide α_{S1} -CN (f1-23) (Hill, Lahav, & Givol, 1974). The same peak at m/z 2764
318 was found in our work in the “Coalho” cheese suggesting the same hydrolysis of α_{S1} -
319 CN catalyzed by chymosin A peak at which has the same mass as α_{S1} -CN (f1-23) was
320 detected by Piraino, et al. (2007) in cheeses type Edam, Cooleeney, Camembert, Swiss,
321 Parmigiano-Reggiano (purchased in Italy), Port du Salut, Cheddar (young), smeared
322 Cheddar and Gruyere-type (surface and core) and was not detected in ripened Cheddar
323 cheese. But Sforza, Ferroni, Galaverna, Dossena, and Marchelli (2003) reported the
324 same peptide from oligopeptides in Grana Padano Cheese. Cell envelope-associated
325 proteinases (CEP) and endopeptidases of starter and non-starter bacteria that are able to

326 hydrolyze α_{S1} -CN (f1–23) rapidly at the bonds Gln₉-Gly₁₀, Gln₁₃-Glu₁₄, Glu₁₄-Val₁₅ and
327 Leu₁₆-Asn₁₇ (Exterkate, Lagerwerf, Haverkamp, & van Schalkwijk, 1997), producing
328 the peptides α_{S1} -CN (f1-14) and α_{S1} -CN (f1-18), the same peptides were found in all
329 “Coalho” cheeses studied.

330 The “Coalho” cheese samples presented the peptides α_{S1} -CN (f29-35), α_{S1} -CN
331 (f26-35), α_{S1} -CN (f24-32) α_{S1} -CN (f24-36), α -CN (f24-38), α -CN (f86-98) and α_{S1} -CN
332 (143-149) which are already identified according to those reported by the following
333 authors: Alli, Okoniewska, Gibbs, and Konishi (1998), identified two peptides α_{S1} -CN
334 (f29-35) and α_{S1} -CN (f26-35) originated from 24-35 residues region in α -casein,
335 contained in mild, medium and sharp Cheddar, and just one α_{S1} -CN (f24-32) in mild
336 Cheddar; Exterkate and Alting (1995), studying the initial secondary proteolysis in α -
337 casein, found high susceptibility of α_{S1} -23/22/20/18 bonds to cleavage by the starter
338 CEP, producing α -CN (f24-36) which also found in gouda cheese (Exterkate,
339 Lagerwerf, Haverkamp, & Van Schalkwijk, 1997). While Sforza, Ferroni, Galaverna,
340 Dossena, and Marchelli (2003) evaluating oligopeptides in Grana Padano Cheese found
341 α -CN (f24-38) and Gouldsworthy, Leaver, and Banks (1996) identified the α -CN (f86-98)
342 during the characterization of the peptide isolated from a water-soluble fraction from
343 commercial mature Cheddar. The α_{S1} -CN (143-149) was found by Larsson, Zakora,
344 Dejmek, and Ardö (2006) in their studies about the specificity of plasmin and chymosin
345 in primary proteolysis from starter-free cheese model made with microfiltered milk.

346 Because the number of peptides formed, our results suggest that in addition to
347 those cleavages of chymosin sensitive bonds, others peptidic bonds in this segment of
348 the casein were also sensitive to cleavage during manufacture of artisanal “Coalho”
349 cheeses. Results that can be justified based on previous reports about the hydrolysis of
350 bonds between residues 23-24 and 24-25 are sensitive to chymosin hydrolysis (Kamaly

351 & Marth, 1989; Law, Sharpe, & Reiter, 1974). Two of these bonds (28-29, 32-33) have
352 been reported as cleavage sites by chymosin (Mulvihilla & Patrick, 1979). Alli,
353 Okoniewska, Gibbs, and Konishi (1998) analyzing the proteolysis in Cheddar cheese,
354 also found a lot of peptides from different lyse types (16-17, 18-19, 25-26-27, 34-35-
355 36).

356 Among the caseinophosphopeptides (CPPs) identified, the α _{S2}-CN4P (f1-19)
357 have been previously characterized by Adamson et al. (1995) after hydrolysis of sodium
358 caseinate with pancreatin-enzyme while Miquel et al. (2006) found peptides α _{S2}-CN4P
359 (f1-19) and α _{S2}-CN1P (73-91) analyzing casein phosphopeptides from bovine casein
360 during the intestinal step using simulated physiological digestion. These peptides above
361 were also detected in “Coalho” cheese samples.

362 It was determined high moisture value of “Coalho” cheese (data not shown),
363 what second Exterkate, Lagerwerf, Haverkamp, and Van Schalkwijk (1997), affects the
364 selectivity of chymosin, because the water structuring components can influence the
365 availability of water molecules which contribute to the properties (conformation) of the
366 enzyme and/or the substrate. Consequently, the complex interactions between forces
367 regulating binding specificity might change, resulting in a new order of preference of
368 susceptible sites. Structural rearrangements in the substrates and/or in the enzyme itself
369 upon transfer into the cheese matrix could have resulted in the changed preference of
370 chymosin in cheese for peptide bonds in the susceptible part of α and β -casein. What
371 can justify the variety of peptides found in artisanal “Coalho” cheese which can be due
372 to other nonspecific hydrolysis by chymosin or starter culture bacteria.

373 In relation to bioactivity, according to Ellegård, Gammelgård-Larsen, Sørensen,
374 and Fedosov (1999) the phosphorylated peptides α _{S2}-CN4P (f2-21) and α _{S2}-CN3P (f46-
375 70) often are related to calcium binding activity and inhibited calcium phosphate

376 crystallization. Miquel et al. (2006) discussed about the peptide α_{S1} -CN41P (f73-91)
377 which were involved with mineral carrier properties in the gastrointestinal tract. For
378 Anadón et al. (2010), the peptide α_{S1} -CN (f143-149) has properties antihypertensive and
379 no toxicity in high oral doses in rats.

380 The peptide α_{S1} -CN (f86-98) (AYFYPEL) obtained by enzymatic hydrolysis,
381 with pepsin, of casein exerted antihypertensive activity after oral administration in
382 spontaneously hypertensive rats, and showed to inhibit angiotensin-converting enzyme
383 (ACE) based on IC_{50} values of 6.6 μ M (Contreras, Carrón, Montero, Ramos, & Recio,
384 2009).

385 Antibacterial (lactobacilli and other Gram-positive bacteria, *S. aureus*,
386 *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*) peptide derived from α_{S1} -CN
387 treated with chymosin, called isracidin, which corresponded to the N-terminal fragment
388 of this protein (f1–23), was isolated (Hill, Lahav, & Givol, 1974). This peptide also
389 safeguarded sheep and cows against mastitis when injected into the udder at levels
390 comparable to those observed with standard antibiotic treatment. In addition, the
391 isracidin α_{S1} -CN (f1- 23) (Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-
392 Glu-Val-Leu-Asn-Glu- Asn-Leu-Leu-Arg-Phe) possesses immunomodulatory effects
393 (Lahov & Regelson, 1996).

394

395 3.2.2. Peptides from β -casein

396

397 Table 3 shows 15 peptides which were identified as originating from β -casein,
398 with molecular weight between 970 and 3043 Da. The 10 peptides β -CN (f199-209), β -
399 CN (f58-68), β -CN (f191-204), β -CN (f192-206), β -CN (f193-208), β -CN (f193-209),
400 β -CN (f14-28)3P, β -CN (f58-78), β -CN (f108-127) and β -CN (f133-153) were found in

401 all cheeses evaluated. The cheeses from Cachoeirinha and São Bento do Una cities
402 showed one peptide β -CN (f6-14) while the β -CN (f27-40) peptide was found in
403 samples from Arcoverde and Cachoeirinha cities. The β -CN (f33-48) peptide was
404 detected in all cheese samples except that one from Capoeiras city. The peptide β -CN
405 (f35-51) was found in Correntes and Capoeiras cheeses, and peptide β -CN3P (f1-25) in
406 cheeses from Capoeiras, São Bento do Una and Venturosa cities.

407 Within 15 peptides identified, 4 of them were casein phosphopeptides from β -
408 casein fractions within in the range from 1 up to 91 aminoacid residues. The majority
409 of β -casein peptides identified resulted from the C-terminal end between residues
410 Leu₁₉₂-Val₂₀₉.

411

412 INSERT TABLE 3 HERE

413

414 However, the most common peptide found in the cheese varieties, particularly in
415 cheddar cheese, produced using chymosin, showed mass spectra characterized by the
416 presence of a single peptide (m/z 1881) according to Rossano et al. (2005). In this
417 study, a predominant peak was detected at m/z 1881 in all samples of “Coalho” cheese
418 most likely corresponding to the peptide β -CN (f193–209) (MW 1881 Da). In fact, this
419 peptide is produced in cheese by the action of chymosin on β -casein at Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃
420 (Visser & Slangen, 1977) but the cell envelope proteinase of *Lactococcus lactis* may
421 also be involved (Kunji, Mierau, Hagting, Poolman, & Konings, 1996), and its
422 accumulation in cheese is frequently associated with bitterness (Soeryapranata et al.,
423 2002). The control of bitterness in cheese is based on the formation of rate bitter
424 peptides and broken down without reaching the level to cause bitter taste (Rocco et al.,
425 2011). This peptide appears to be very resistant to both chymosin and cell-envelope

426 proteinase (CEP) (Exterkate & Alting, 1995), and it is an important cause of bitterness
427 in Gouda cheese, and was attributed to the degradation of β -casein by rennet and starter
428 cultures (Visser, Slangen, Hup, & Stadhouders, 1983). Reid, Ng, Moore, Coolbear, &
429 Pritchard (1991) also identified this peptide as hydrolysis product of β -casein by
430 *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* while Guillou, Miranda, and Pelissier (1991)
431 reported the same peptide as product of hydrolysis of β -casein by bovine chymosin.

432 The β -casein peptide, β -CN (f193-208), identified in all the “Coalho” cheese
433 analyzed, has an N-terminal consistent with the known proteolytic cleavage at Ile₂₀₈-
434 Val₂₀₉ by chymosin, or the lactococcal proteinase type (carboxypeptidase) (Reid, Ng,
435 Moore, Coolbear, & Pritchard, 1991). Similar peptides β -CN (f193–209) and (f193-
436 208) were studied by Piraino et al. (2007) in samples of: Cheddar, Parmigiano–
437 Reggiano cheeses purchased in Italy and Ireland; Stilton; Swiss cheese; Edam;
438 Cooleeney Camembert; Port du Salut and Camembert.

439 According to Rossano, et al. (2005) evaluating the miniature Cheddar-type
440 cheeses, the peptide β -CN (f193–209) was the principal component in mass
441 spectrometer analysis, which is characteristic of cheeses made using chymosin. The
442 other peptide identified was β -CN (f199–209) what suggests that this fragment is
443 generally produced by the peptidase activity of starter or non-starter microorganisms. .
444 The peptide β -CN (f192-206) was also characterized as water-soluble peptides in
445 Cheddar cheese (Gouldsworthy, Leaver, & Banks, 1996). The peptide β -CN (f6-14)
446 was found by Alli, Okoniewska, Gibbs, and Konishi (1998) and Reid, Ng, Moore,
447 Coolbear, and Pritchard (1991) in Cheddar cheese flavor after the hydrolysis of β -casein
448 by proteinases from *Lactococcus lactis* in cleavage sites identified: Phe₅-Met₆, Pro₇-
449 Trp₈ and Met₁₉₂-Try₁₉₃.

450 Haileselassie, Lee, and Gibbs (1999) studied peptides potentially
451 antihypertensive obtained from enzyme-modified cheese (milk Cheddar cheese) among
452 the identified peptides. In this work, it was possible to characterized two of them in the
453 “Coalho” cheese, the β -CN (f58-78) and β -CN (f108-127) with the sequence of amino
454 acids (LVYFPFGPIPNSLPQNIPPLT) and (SLVYFPFGPIPNSLLPQNIPPLT)
455 respectively. This process can be an alternative for the production of antihypertensive
456 agents.

457 The proteolysis in cast cheese catalyzed by plasmin and chymosin produced the
458 peptide β -CN (f133-153) second while by elastase (Considine, Healy, Kelly, &
459 McSweeney, 1999) on bovine β -casein were obtained the peptides β -CN (f35-51) and β -
460 CN (f191-204) (Larsson, Zakora, Dejmek, & Ardö, 2006). In the same way, Lapointe,
461 Mollé, Gauthier, and Pouliot (2004) analyzed the hydrolysis of bovine β -casein by bovine
462 trypsin and thermolysin finding similar peptide β -CN (f58-68). These published results
463 were similar to those obtained for the “Coalho” cheese in spite of those peptides, which,
464 in this case, were produced by the action of rennet and other proteolytic agents present
465 in regional cow milk, suggesting a similar cleavage sites.

466 It has been published that the initial distribution of salt and moisture inside the
467 cheese may be the main determinant of the β -CN degradation and other aspects of
468 proteolysis. The amount of salt influences the solubility of β -CN due to competition for
469 water of hydration, which lead to hydrophobic aggregation of β -CN resulting in the
470 masking of the bonds which are most susceptible to chymosin and to CEP (Exterkate,
471 Lagerwerf, Haverkamp, & Van Schalkwijk, 1997). Salt in “Coalho” cheese is unevenly
472 distributed initially, being high at the rind and low in the inner part, and it thus promotes
473 the aggregation of β -CN to different extents. In fact, this can justified the presence of 6
474 peptides from β -caseina fragment (191-209).

475 The results obtained from “Coalho” cheese showed several peptides which
476 second the literature were potential bioactive peptides, as can be showed in the
477 following citations: The β -CN (f193-209) formed by 17 residues of amino acid in the
478 following sequence (Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-
479 Ile-Val) displayed immunomodulatory properties and mitogenic activity on primed
480 lymph node cells and unprimed rat spleen cells (Coste et al., 1992); chemotactic activity
481 on L14 lymphoblastoid cell line (Fronteau et al., 1998); enhanced phagocytosis in rat
482 macrophages (Sandré et al., 2001). Also, this peptide produced by proteinase from *Lc.*
483 *Lactis* ssp. *cremoris* presented antihypertensive effect and inhibited endopeptidases and
484 aminopeptidases in lactic acid bacteria. Peptidases from lactic acid bacteria differ in
485 their sensitivity to the same peptides (Gobbetti, Stepaniak, De Angelis, Corsetti, & Di
486 Cagno, 2002).

487 In spite of β -CN (f6–14) peptide that was found in two fermented milks,
488 contained ACE-inhibitory activity produced by selected *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
489 and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Gobbetti, Ferranti, Smacchi, Goffredi, & Addeo,
490 2000).

491 Sabeena Farvin, Baron, Nielsen, Otte, and Jacobsen (2010) studied by mass
492 spectrometry peptides from bovine milk yogurt, fragments of β -casein in the regions β -
493 CN (f191-208) and β -CN (f191-207) showed antioxidant activity, in our study was
494 found that peptides within the same range.

495 For the phosphorylated peptides, evaluating from oligopeptides in Grana Padano
496 Cheese also found the peptide β -CN 3P (f14-28) which had ion binding activity (Sforza,
497 Ferroni, Galaverna, Dossena, & Marchelli, 2003). The characterization of the bioactive
498 casein phosphopeptides, β -CN1P (f33-48) and β -CN3P (f1-25) showed the calcium

499 binding capacity, inhibitory effect on calcium phosphate crystallization and
500 precipitation (Ellegård, Gammelgård-Larsen, Sørensen, & Fedosov, 1999).

501 The discussion was related to only identified peptides, but several unknown
502 peptides were found in the “Coalho” cheese, maybe due to a complex lactic microbial
503 culture which showed different cleavage sites of casein. In this way, beyond of the more
504 intense peptide (1881 Da) identified as β -CN (f193-209) hydrolysis product, there were
505 more three not-identified peptides with high intensity in all analyzed “Coalho” cheese
506 samples with molecular weight of 1597, 1725/1726 and 2778/2779 Da, suggesting that
507 these peptides can be a possible marker for “Coalho” cheese from semi-arid region of
508 Pernambuco state in Brazil.

509

510 3.3.3. Peptides from κ -casein

511

512 Table 4 shows three peptides identified as originating from κ -casein hydrolysis
513 in the “Coalho” cheeses analyzed. But, just one peptide κ -CN (f51-60) (MW 1269 Da)
514 was present in all cheese samples; this peptide indicates the presence of cleavage sites in
515 the region of residues 43-61 in the κ -casein molecule. The κ -CN (f161-169) was found
516 in Correntes cheese and κ -CN (f152-160) peptides were presented in Arcoverde and
517 Venturosa samples, indicating the presence of cleavage sites in the region 151-169 (C-
518 terminal end) of κ -casein. Some of these peptides were identified by Alli, Okoniewska,
519 Gibbs, and Konishi (1998) in Cheddar Cheese and Cheddar Cheese Flavor, which are
520 involved in the cheese flavor. Comparing to α -casein and β -casein, there are relatively
521 few reports about the cleavage sites of κ -casein by chymosin or starter culture bacterial
522 proteinases (Alli, Okoniewska, Gibbs, & Konishi, 1998). Chymosin hydrolyzes κ -casein
523 specifically at the Phe₁₀₅-Met₁₀₆ (Turhan & Mutlu, 1998) and Kamaly and Marth (1989)

524 suggested that this hydrolysis occurs during early enzymatic coagulation of milk.
525 However, in the series of the identified peptides in the present work, cleavage at the
526 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ site was not observed. Our results indicate the presence of cleavage sites
527 in the region of residues 50-60 and 151-169 (C-terminal end) of κ -casein. Similar
528 results were found by Alli, Okoniewska, Gibbs, and Konishi (1998), which reported
529 other cleavage sites such as residues: 44-51; 46-52; 51-60; 43-61; 152-160; 161-169 and
530 151-169.

531 Gómez-Ruiz, López-Expósito, Pihlanto, Ramos, and Recio (2008) reported the
532 study about hydrolysates from ovine casein by pepsin, trypsin and chymotrypsin.
533 Among the peaks obtained, the authors found a peak with similar molecular weight to
534 that observed in this work, fraction κ -CN (f152-160) with 999 Da, characterized as
535 peptides with antioxidant properties.

536 All these experimental procedures were carried out again for “Coalho” cheeses
537 collected in the same cities after 3 months, showing the same results (data not shown) in
538 spite of protein and peptide profiles. These results confirmed that these profiles were
539 maintained for all “Coalho” cheeses from semi-arid (Agreste) region of Pernambuco
540 State – Brazil.

541

542 **4. Conclusions**

543

544 During the manufacturing of artisanal “Coalho” cheese several peptide bonds in
545 the caseins are hydrolyzed. The nitrogen components of cheese consist of a mixture of
546 native caseins, high, medium, and low molecular mass peptides, and free amino acids.
547 An average of 26 peptides from α , β , κ -caseins was identified and 40 peptides,
548 moreover, non-identified. This high number of non-identified peptides shows a high

549 degree of hydrolysis, which may suggest that the “Coalho” cheese has a complex
550 microbial process with enzymes from starter lactic acid bacteria (LAB), non-starter
551 lactic bacteria (NSEAB) or secondary microflora in the cheese. The products of this
552 proteolysis can contribute to quality sensory characteristics of cheese, and many of them
553 have biological activities such as mineral-binding, antioxidant, antihypertensive,
554 antimicrobial, immunomodulatory, aggregating value to this regional product.
555 Moreover, it was possible to obtain very accurate molecular masses of peptides by
556 MALDI-ToF, hence facilitating better understanding of their origins, based on the
557 known specificities, and can still be used to evaluate adulteration in dairy products,
558 because the news peptides can be a possible marker for “Coalho” cheese from semi-arid
559 region of Pernambuco state in Brazil.

560

561 **Acknowledgments**

562 The authors thank the financial support of FACEPE (Fundação de Amparo à
563 Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), LIKA (Laboratório de
564 Imunopatologia Keizo Asami), UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) and
565 UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco).

566

567 **Conflict of interest**

568 The authors declare that they have no conflict of interest.

569

570 **References**

571

572 Alli, I., Okoniewska, M., Gibbs, B. F., & Konishi, Y. (1998). Identification of Peptides
573 in Cheddar Cheese by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *International*
574 *Dairy Journal*, 8(7), 643-649.

- 575 Anadón, A., Martínez, M. A., Ares, I., Ramos, E., Martínez-Larrañaga, M. R.,
576 Contreras, M. M., Ramos, M., & Recio, I. (2010). Acute and repeated dose (4
577 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLGY and
578 AYFYPEL, that correspond to fragments (90-94) and (143-149) from α 1-
579 casein. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1836-1845.
- 580 Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J.,
581 Polikarpov, I., North, A. C. T., & Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at
582 1.8 Å resolution - Still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481-495.
- 583 Cavalcante, J. F. M., Andrade, N. J. d., Furtado, M. M., Ferreira, C. L. d. L. F., Pinto, C.
584 L. d. O., & Elard, E. (2007). Processamento do queijo coalho regional
585 empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia*
586 *de Alimentos*, 27, 205-214.
- 587 Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L., & McSweeney, P. L. H. (1999). Proteolytic
588 specificity of elastase on bovine β -casein. *Food Chemistry*, 66(4), 463-470.
- 589 Contreras, M. d. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel
590 casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy*
591 *Journal*, 19(10), 566-573.
- 592 Coste, M., Rochet, V., Leonil, J., Molle, D., Bouhallab, S., & Tome, D. (1992).
593 Identification of C-terminal peptides of bovine β -casein that enhance
594 proliferation of rat lymphocytes. *Immunology Letters*, 33(1), 41-46.
- 595 De Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in
596 Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597-608.
- 597 Dupont, D., Arnould, C., Rolet-Repecaud, O., Duboz, G., Faurie, F., Martin, B., &
598 Beuquier, E. (2006). Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese

- 599 with specific monoclonal antibodies. *International Dairy Journal*, 16(9), 1081-
600 1087.
- 601 Ellegård, K. H., Gammelgård-Larsen, C., Sørensen, E. S., & Fedosov, S. (1999).
602 Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of
603 tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal*, 9(9),
604 639-652.
- 605 Exterkate, F. A., & Alting, A. C. (1995). The role of starter peptidases in the initial
606 proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *International Dairy*
607 *Journal*, 5(1), 15-28.
- 608 Exterkate, F. A., Lagerwerf, F. M., Haverkamp, J., & van Schalkwijk, S. (1997). The
609 selectivity of chymosin action on α s1- and β -caseins in solution is modulated in
610 cheese. *International Dairy Journal*, 7(1), 47-54.
- 611 Farnaud, S., & Evans, R. W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with
612 antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40(7), 395-405.
- 613 Feligini, M., Bonizzi, I., Buffoni, J. N., Cosenza, G., & Ramunno, L. (2009).
614 Identification and Quantification of α S1, α S2, β , and κ -Caseins in Water Buffalo
615 Milk by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography and Mass
616 Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2988-2992.
- 617 Ferrandini, E., López, M. B., Castillo, M., & Laencina, J. (2011). Influence of an
618 artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al
619 Vino cheese. *Food Chemistry*, 124(2), 583-588.
- 620 Flower, D. R., North, A. C., & Attwood, T. K. (1993). Structure and sequence
621 relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein science : a*
622 *publication of the Protein Society*, 2(5), 753-761.

- 623 Fronteau, D., Tanneau, G., Henry, G., Chevaleyre, C., Léonil, J., & Salmon, H. (1998).
624 Activité chimiotactique de lait d'artiodactyle sur les lymphocytes porcins.
625 *Journées Recherche Porcine en France*, 30, 363-367.
- 626 Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. (2000). Production of
627 Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks
628 Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus*
629 *lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(9), 3898-3904.
- 630 Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002).
631 Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and
632 significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and*
633 *Nutrition*, 42(3), 223-239.
- 634 Gómez-Ruiz, J., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., & Recio, I. (2008).
635 Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active
636 peptides by HPLC–MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227(4),
637 1061-1067.
- 638 Gouldsworthy, A. M., Leaver, J., & Banks, J. M. (1996). Application of a mass
639 spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar
640 cheese. *International Dairy Journal*, 6(8-9), 781-790.
- 641 Guillou, H., Miranda, G., & Pelissier, J. P. (1991). Hydrolysis of β -casein by gastric
642 proteases. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37(6), 494-
643 501.
- 644 Haileselassie, S. S., Lee, B. H., & Gibbs, B. F. (1999). Purification and Identification of
645 Potentially Bioactive Peptides from Enzyme-Modified Cheese. *Journal of Dairy*
646 *Science*, 82(8), 1612-1617.

- 647 Hayaloglu, A. A., Brechany, E. Y., Deegan, K. C., & McSweeney, P. L. H. (2008).
648 Characterization of the chemistry, biochemistry and volatile profile of Kuflu
649 cheese, a mould-ripened variety. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(7),
650 1323-1334.
- 651 Hill, R. D., Lahav, E., & Givol, D. (1974). A rennin-sensitive bond in α_{s1} β -casein.
652 *Journal of Dairy Research*, *41*(01), 147-153.
- 653 Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in*
654 *Colloid & Interface Science*, *11*(2-3), 148-153.
- 655 Kamaly, K. M., & Marth, E. H. (1989). Enzyme Activities of Lactic Streptococci and
656 Their Role in Maturation of Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science*, *72*(8),
657 1945-1966.
- 658 Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The
659 proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*(2),
660 187-221.
- 661 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
662 of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- 663 Lahov, E., & Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived
664 substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical*
665 *Toxicology*, *34*(1), 131-145.
- 666 Lapointe, J.-F., Mollé, D., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2004). Effect of calcium on
667 thermolysin hydrolysis of β -casein tryptic peptides. *International Dairy Journal*,
668 *14*(3), 185-193.
- 669 Larsson, M., Zakora, M., Dejmek, P., & Ardö, Y. (2006). Primary proteolysis studied in
670 a cast cheese made from microfiltered milk. *International Dairy Journal*, *16*(6),
671 623-632.

- 672 Law, B. A., Sharpe, M. E., & Reiter, B. (1974). The release of intracellular dipeptidase
673 from starter streptococci during Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy*
674 *Research*, 41(01), 137-146.
- 675 Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Texture Development During
676 Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748-1760.
- 677 Lefèvre, T., & Subirade, M. (2000). Molecular differences in the formation and
678 structure of fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels. *Biopolymers*,
679 54(7), 578-586.
- 680 Legrand, D., Ellass, E., Pierce, A., & Mazurier, J. (2004). Lactoferrin and host defence:
681 An overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties.
682 *BioMetals*, 17(3), 225-229.
- 683 Liland, K. H., Mevik, B.-H., Rukke, E.-O., Almøy, T., & Isaksson, T. (2009).
684 Quantitative whole spectrum analysis with MALDI-TOF MS, Part II:
685 Determining the concentration of milk in mixtures. *Chemometrics and*
686 *Intelligent Laboratory Systems*, 99(1), 39-48.
- 687 Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins.
688 *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1537S-1543S.
- 689 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein
690 measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological*
691 *chemistry*, 193(1), 265-275.
- 692 Markus, C. R., Olivier, B., & De Haan, E. H. F. (2002). Whey protein rich in α -
693 lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other
694 large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-
695 vulnerable subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(6), 1051-1056.

- 696 McAlpine, A. S., & Sawyer, L. (1990). β -lactoglobulin: a protein drug carrier?
697 *Biochemical Society Transactions*, 18, 879.
- 698 McIntosh, G. H., Royle, P. J., Le Leu, R. K., Regester, G. O., Johnson, M. A., Grinsted,
699 R. L., Kenward, R. S., & Smithers, G. W. (1998). Whey Proteins as Functional
700 Food Ingredients? *International Dairy Journal*, 8(5-6), 425-434.
- 701 Miquel, E., Ángel Gómez, J., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., & Recio, I. (2006).
702 Identification of casein phosphopeptides after simulated gastrointestinal
703 digestion by tandem mass spectrometry. *European Food Research and*
704 *Technology*, 222(1), 48-53.
- 705 Mulvihilla, D. M., & Patrick, F. F. (1979). Proteolytic specificity of chymosin on
706 bovine α 1-casein. *Journal of Dairy Research*, 46(4), 641-651.
- 707 Narayan, M., & Berliner, L. J. (1997). Fatty acids and retinoids bind independently and
708 simultaneously to β - lactoglobulin. *Biochemistry*, 36(7), 1906-1911.
- 709 Pan, Y., Shiell, B., Wan, J., Coventry, M. J., Roginski, H., Lee, A., & Michalski, W. P.
710 (2007). The molecular characterisation and antimicrobial activity of amidated
711 bovine lactoferrin. *International Dairy Journal*, 17(6), 606-616.
- 712 Pappa, E. C., Robertson, J. A., Rigby, N. M., Mellon, F., Kandarakis, I., & Mills, E. N.
713 C. (2008). Application of proteomic techniques to protein and peptide profiling
714 of Teleme cheese made from different types of milk. *International Dairy*
715 *Journal*, 18(6), 605-614.
- 716 Park, Y. W., & Jin, Y. K. (1998). Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack
717 hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses.
718 *Small Ruminant Research*, 28(3), 263-272.

- 719 Piraino, P., Upadhyay, V. K., Rossano, R., Riccio, P., Parente, E., Kelly, A. L., &
720 McSweeney, P. L. H. (2007). Use of mass spectrometry to characterize
721 proteolysis in cheese. *Food Chemistry*, *101*(3), 964-972.
- 722 Reid, J. R., Ng, K. H., Moore, C. H., Coolbear, T., & Pritchard, G. G. (1991).
723 Comparison of bovine β -casein hydrolysis by P(I) and P(III)-type proteinases
724 from *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and*
725 *Biotechnology*, *36*(3), 344-351.
- 726 Rossano, R., Larocca, M., Lamaina, A., Viggiani, S., & Riccio, P. (2011). The
727 hepatopancreas enzymes of the crustaceans *Munida* and their potential
728 application in cheese biotechnology. *LWT - Food Science and Technology*,
729 *44*(1), 173-180.
- 730 Rossano, R., Piraino, P., D'Ambrosio, A., O'Connell, O. F., Ungaro, N., McSweeney, P.
731 L. H., & Riccio, P. (2005). Proteolysis in miniature cheddar-type cheeses
732 manufactured using extracts from the crustacean *Munida* as coagulant. *Journal*
733 *of Biotechnology*, *120*(2), 220-227.
- 734 Sabeena Farvin, K. H., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., & Jacobsen, C. (2010).
735 Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide
736 fractions. *Food Chemistry*, *123*(4), 1090-1097.
- 737 Sandré, C., Gleizes, A., Forestier, F., Gorges-Kergot, R., Chilmonczyk, S., Leónil, J.,
738 Moreau, M. C., & Labarre, C. (2001). A Peptide Derived from Bovine b-Casein
739 Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from
740 Germfree and Human Flora-Associated Mice. *American Society for Nutritional*
741 *Sciences*, *131*, 2936-2942.
- 742 Sforza, S., Ferroni, L., Galaverna, G., Dossena, A., & Marchelli, R. (2003). Extraction,
743 Semi-Quantification, and Fast On-line Identification of Oligopeptides in Grana

- 744 Padano Cheese by HPLC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
745 51(8), 2130-2135.
- 746 Sgarbieri, C. V. (2005). Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk
747 Proteins. *Brazilian Journal Food Technology*, 8(1), 43-56.
- 748 Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides.
749 *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15.
- 750 Soeryapranata, E., Powers, J. R., Fajarrini, F., Weller, K. M., Hill, H. H., & Siems, W.
751 F. (2002). Relationship between MALDI-TOF Analysis of β -CN f193–209
752 Concentration and Sensory Evaluation of Bitterness Intensity of Aged Cheddar
753 Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4900-4905.
- 754 Strohalm, M., Kavan, D., Novák, P., Volný, M., & Havlíček, V. (2010). MMass 3: A
755 cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric
756 data. *Analytical Chemistry*, 82(11), 4648-4651.
- 757 Swart, P. J., Harmsen, M. C., Kuipers, M. E., Van Dijk, A. A., Van Der Strate, B. W.
758 A., Van Berkel, P. H. C., Nuijens, J. H., Smit, C., Witvrouw, M., De Clercq, E.,
759 De Béthune, M. P., Pauwels, R., & Meijer, D. K. F. (1999). Charge modification
760 of plasma and milk proteins results in antiviral active compounds. *Journal of*
761 *Peptide Science*, 5(12), 563-576.
- 762 Turhan, M., & Mutlu, M. (1998). Kinetics of k-Casein/Immobilized Chymosin
763 Hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 342-347.
- 764 Van Belzen, N. (2002). The role of lactoferrin in cancer prevention. *Sciences des*
765 *Aliments*, 22(4), 461-468.
- 766 Visser, S., & Slangen, K. J. (1977). On the specificity of chymosin (rennin) in its action
767 on bovine β -casein. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 31, 16–30.

768 Visser, S., Slangen, K. J., Hup, G., & Stadhouders, J. (1983). Bitter flavour in cheese. 3.
769 Comparative gel-chromatographic analysis on hydrophobic peptide fractions
770 from twelve Gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated
771 from a cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP. . *Netherlands Milk*
772 *Dairy Journal*, 37, 181–192.

773

774 **Figure legends**

775

776 **Fig. 1.** Production flowchart of artisanal “Coalho” cheese from semi-arid (Agreste)
777 region of Pernambuco State-Brazil.

778

779 **Fig. 2.** SDS-PAGE (15%) of proteins from artisanal “Coalho” cheeses. Lines: molecular
780 weight markers (A) and cities: Arcoverde (B); Cachoeirinha (C); Capoeiras (D);
781 Correntes (E); São Bento do Una (F); Venturosa (G).

782

783

784 **Fig. 3.** MALDI-ToF mass spectra of water-soluble peptides from artisanal “Coalho”
785 cheeses. Only peptides with $m/z < 3500$ were monitored. The cities: Arcoverde (A) and
786 Cachoeirinha (B).

787

788 **Fig. 4.** MALDI-ToF mass spectra of water-soluble peptides from artisanal “Coalho”
789 cheeses. Only peptides with $m/z < 3500$ were monitored. The cities: São Bento do Una
790 (C) and Veturosa (D).

791

792 **Fig. 5.** MALDI-ToF mass spectra of water-soluble peptides from artisanal “Coalho”
793 cheeses. Only peptides with $m/z < 3500$ were monitored. The cities: Venturosa (E) and
794 Correntes (F).

795 **Table 1.**

796

797 Molecular weight (MW) species identified in the artisanal “Coalho” cheese samples
 798 using mass spectrometry (MALDI-ToF). Species whose MW are typed in bold were
 799 confirmed as peptides.

Samples	Molecular weight species
Arcoverde	902, 999 , 1024, 1052 , 1098, 1143, 1151 , 1172, 1209, 1253, 1269 , 1360, 1383, 1399, 1421, 1468, 1493, 1511, 1568 , 1597, 1609, 1623 , 1649, 1676, 1708 , 1726, 1762, 1790 , 1862, 1881, 2000 , 2018, 2053, 2064 , 2081, 2119 , 2167, 2247, 2263 , 2319, 2343, 2363 , 2391, 2456, 2479 , 2531, 2635 , 2651, 2764 , 2779, 2846, 2929 , 2955, 2968, 3008, 3062, 3069, 3107, 3137, 3146, 3182, 3270, 3331, 3385, 3418, 3484, 3499.
Capoeiras	902 , 909, 1052 , 1096, 1151 , 1208, 1246, 1253, 1269 , 1360, 1385, 1399, 1437, 1468, 1493, 1511, 1568 , 1597, 1609, 1624, 1623 , 1649, 1676, 1708, 1726, 1790, 1881 , 1904, 2000 , 2018, 2119 , 2166, 2263, 2343, 2363, 2409, 2456, 2479 , 2523, 2536, 2635 , 2778, 2843, 2890, 2929 , 2954, 2985, 3043 , 3069, 3104, 3156, 3183, 3269, 3383, 3479, 3493, 3500.
Cachoeirinha	902 , 910, 944, 960, 970 , 1002, 1026, 1052 , 1099, 1151 , 1172, 1252, 1253, 1269 , 1317, 1360, 1384, 1399, 1421, 1437, 1469, 1493, 1511 , 1543, 1568 , 1597, 1609, 1623 , 1626, 1649, 1676, 1708, 1726, 1762, 1790 , 1862, 1881, 2000 , 2018, 2064, 2119 , 2166, 2228, 2246, 2263, 2343, 2363 , 2395, 2479 , 2523, 2635 , 2649, 2692, 2778, 2929 , 2954, 2981, 3012, 3068, 3106, 3141, 3187, 3209, 3271, 3288, 3378, 3384, 3418, 3483, 3498.
Correntes	902, 906 , 944, 982, 1006, 1025, 1043, 1052 , 1095, 1104, 1120 , 1145, 1151 , 1171, 1209, 1234, 1253, 1269 , 1308, 1318, 1360, 1384, 1399, 1399, 1421, 1438, 1449, 1469, 1493, 1511 , 1535, 1543, 1568 , 1597, 1609, 1623 , 1649, 1676, 1699, 1708 , 1726, 1790 , 1862, 1881, 2000 , 2018, 2053, 2064, 2119 , 2228, 2247, 2263 , 2321, 2343, 2363 , 2388, 2409, 2456, 2479, 2635 , 2744, 2764, 2779, 2929 , 2973, 3066, 3132, 3270, 3384, 3418, 3499.
São Bento do Una	902 , 927, 970 , 1005, 1027, 1052 , 1099, 1115, 1144, 1151 , 1190, 1202, 1244, 1253, 1269 , 1317, 1338, 1360, 1383, 1399, 1421, 1467, 1493, 1511, 1568 , 1597, 1609, 1623, 1676, 1708 , 1725, 1745, 1753, 1790 , 1845, 1881, 2000 , 2018, 2035, 2064 , 2080, 2119 , 2166, 2263 , 2331, 2343, 2363 , 2395, 2444, 2479 , 2522, 2563, 2635 , 2778, 2843, 2888, 2929 , 2970, 3015, 3043 , 3068, 3097, 3134, 3185, 3207, 3269, 3288, 3337, 3383, 3417, 3482, 3498.
Venturosa	805, 906 , 909, 1052 , 1095, 1145, 1151 , 1206, 1209, 1246, 1246, 1253, 1269 , 1360, 1384, 1399, 1437, 1493, 1511 , 1543, 1568 , 1597, 1623 , 1649, 1676, 1708 , 1726, 1751, 1790, 1881 , 1904, 2000 , 2018, 2064, 2119 , 2166, 2230, 2263, 2343, 2363, 2479 , 2523, 2635 , 2739, 2779, 2929 , 2950, 2955, 3043 , 3070, 3102, 3157, 3183, 3271, 3385, 3495, 3502.

800

801

802

803

804

805 **Table 2.**

806

807 List of peptides detected using MALDI-ToF mass spectra in artisanal “Coalho” cheese
 808 from α -Casein proteolysis.

809

Mass (m/z)	Possible casein fragment	ARC *	CAP *	CAC *	COR *	SBU *	VEN *
805	α_{S1} -CN (f29-35)						X
902	α_{S1} -CN (f143-149)	X	X	X	X	X	
1052	α_{S1} -CN (f24-32)	X	X	X	X	X	X
1120	α_{S1} -CN (f26-35)				X		
1493	α_{S1} -CN (f24-36)	X	X	X	X	X	X
1568	α_{S1} -CN (f86-98)	X	X	X	X	X	X
1623	α_{S1} -CN (f1-14)	X	X	X	X	X	X
1708	α_{S1} -CN (f24-38)	X	X	X	X	X	X
2119	α_{S1} -CN (f1-18)	X	X	X	X	X	X
2363	α_{S1} -CN41P (f73-91)	X	X	X	X	X	X
2456	α_{S2} -CN4P (f1-19)	X	X		X		
2635	α_{S2} -CN4P (f2-21)	X	X	X	X	X	X
2764	α_{S1} -CN (f1-23)	X			X		
2929	α_{S2} -CN3P (f46-70)	X	X	X	X	X	X

810

811 * Legend of producer cities of artisanal “Coalho” cheese: Arcoverde (ARC); Capoeiras
 812 (CAP); Cachoeirinha (CAC); Correntes (COR); São Bento do Una (SBU); Venturosa
 813 (VEN).

814 **References that support the peptide identification:** (Alli, Okoniewska, Gibbs, &
 815 Konishi, 1998; Ellegård, Gammelgård-Larsen, Sørensen, & Fedosov, 1999; Exterkate,
 816 Lagerwerf, Haverkamp, & van Schalkwijk, 1997; Lapointe, Mollé, Gauthier, & Pouliot,
 817 2004; Larsson, Zakora, Dejmek, & Ardö, 2006; Miquel et al., 2006; Pappa et al., 2008;
 818 Sforza, Ferroni, Galaverna, Dossena, & Marchelli, 2003).

819

820

821

822

823

824

825 **Table 3.**

826

827 List of peptides detected using MALDI-ToF mass spectra in artisanal “Coalho” cheese
 828 from β -casein proteolysis.

Mass (m/z)	Possible casein fragment	ARC *	CAP *	CAC *	COR *	SBU *	VEN *
970	<i>β-CN (f6-14)</i>			X		X	
1151	<i>β-CN (f199-209)</i>	X	X	X	X	X	X
1253	<i>β-CN (f58-68)</i>	X	X	X	X	X	X
1511	<i>β-CN (f191-204)</i>	X	X	X	X	X	X
1676	<i>β-CN (f192-206)</i>	X	X	X	X	X	X
1762	<i>β-CN (f27-40)</i>	X		X			
1790	<i>β-CN (f193-208)</i>	X	X	X	X	X	X
1881	<i>β-CN (f193-209)</i>	X	X	X	X	X	X
2000	<i>β-CN3P (f14-28)</i>	X	X	X	X	X	X
2064	<i>β-CN1P (f33-48)</i>	X		X	X	X	X
2263	<i>β-CN (f58-78)</i>	X	X	X	X	X	X
2343	<i>β-CN (f108-127)</i>	X	X	X	X	X	X
2409	<i>β-CN (f35-51)</i>		X		X		
2479	<i>β-CN (f133-153)</i>	X	X	X	X	X	X
3043	<i>β-CN3P (f1-25)</i>		X			X	X

829

830 * Legend of producer cities of artisanal “Coalho” cheese: Arcoverde (ARC); Capoeiras
 831 (CAP); Cachoeirinha (CAC); Correntes (COR); São Bento do Una (SBU); Venturosa
 832 (VEN).

833 **References that support the peptide identification:** (Alli, Okoniewska, Gibbs, &
 834 Konishi, 1998; Considine, Healy, Kelly, & McSweeney, 1999; Ellegård, Gammelgård-
 835 Larsen, Sørensen, & Fedosov, 1999; Gouldsworthy, Leaver, & Banks, 1996;
 836 Haileselassie, Lee, & Gibbs, 1999; Lapointe, Mollé, Gauthier, & Pouliot, 2004;
 837 Larsson, Zakora, Dejmek, & Ardö, 2006; R. Rossano, et al., 2005; Sforza, Ferroni,
 838 Galaverna, Dossena, & Marchelli, 2003).

839

840

841

842

843

844

845

846 **Table 4.**

847

848 List of peptides detected using MALDI-ToF mass spectra in artisanal “Coalho” cheese
849 from κ -Casein proteolysis.

Mass (m/z)	Possible casein fragment	ARC	CAP	CAC	COR	SBU	VEN
906	κ -CN (f161-169)				X		
999	κ -CN (f152-160)	X					X
1269	κ -CN (f51-60)	X	X	X	X	X	X

850

851 * Legend of producer cities of artisanal “Coalho” cheese: Arcoverde (ARC); Capoeiras
852 (CAP); Cachoeirinha (CAC); Correntes (COR); São Bento do Una (SBU); Venturosa
853 (VEN).

854 **Reference that support the peptide identification:** (Alli, Okoniewska, Gibbs, &
855 Konishi, 1998)

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

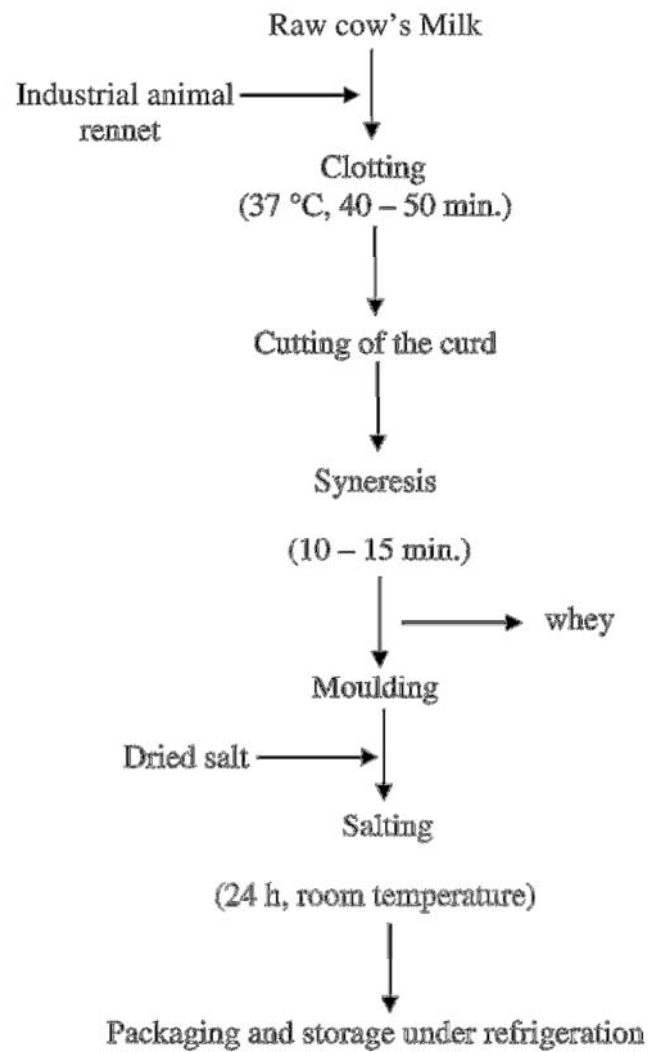
868

869

870

871

872

873 **Figure 1**

923 **Figure 2**

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

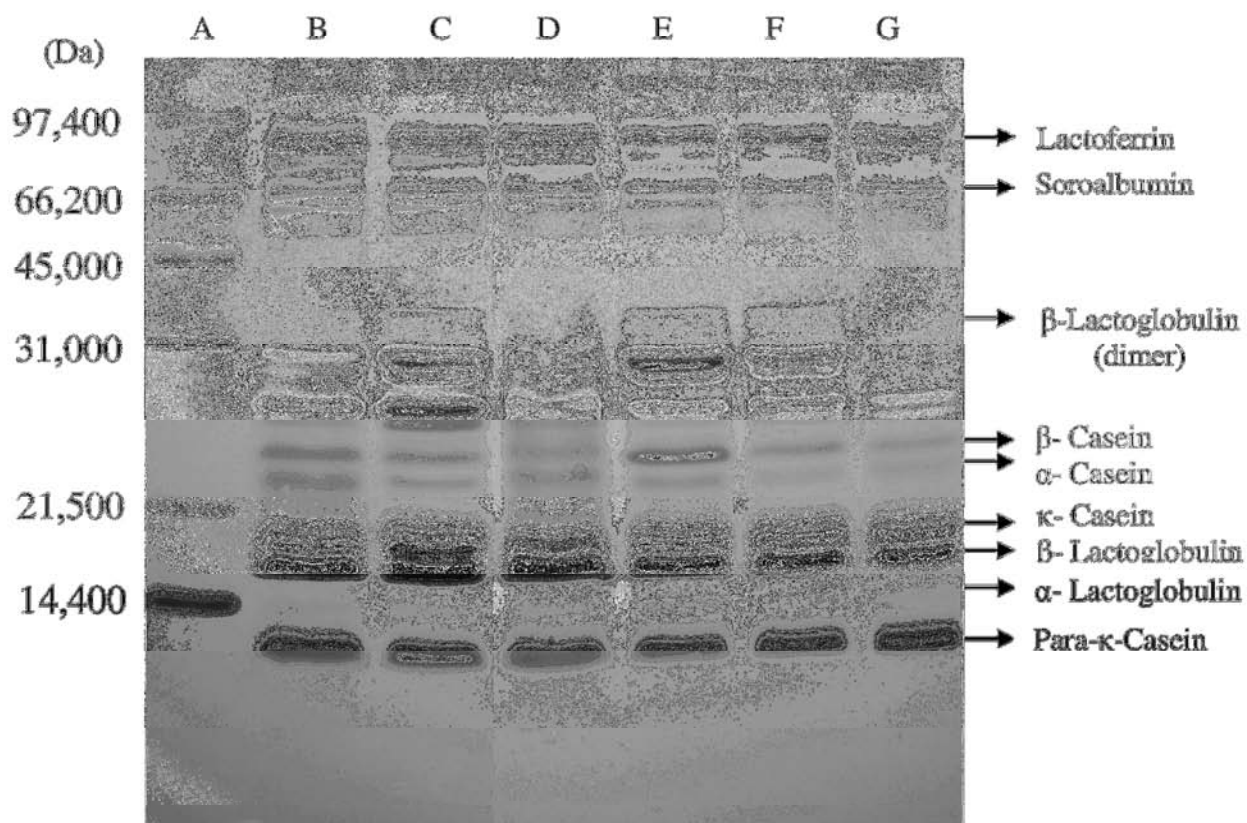
968

969

970

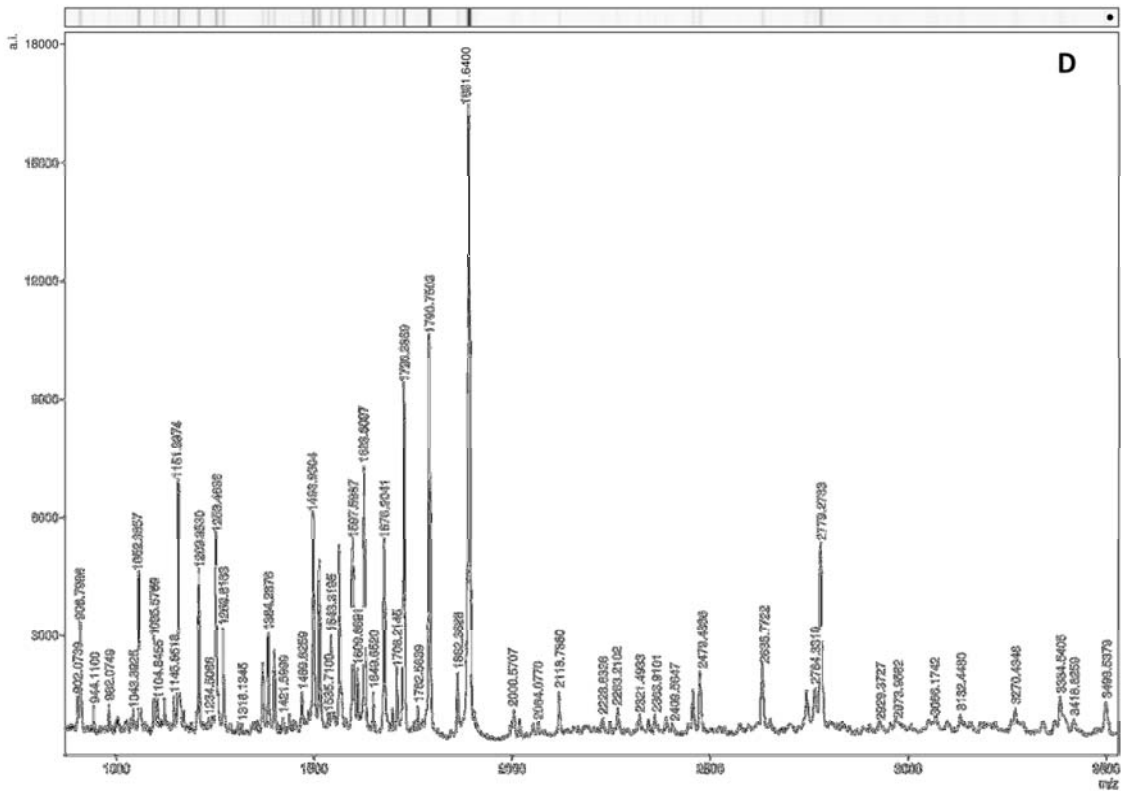
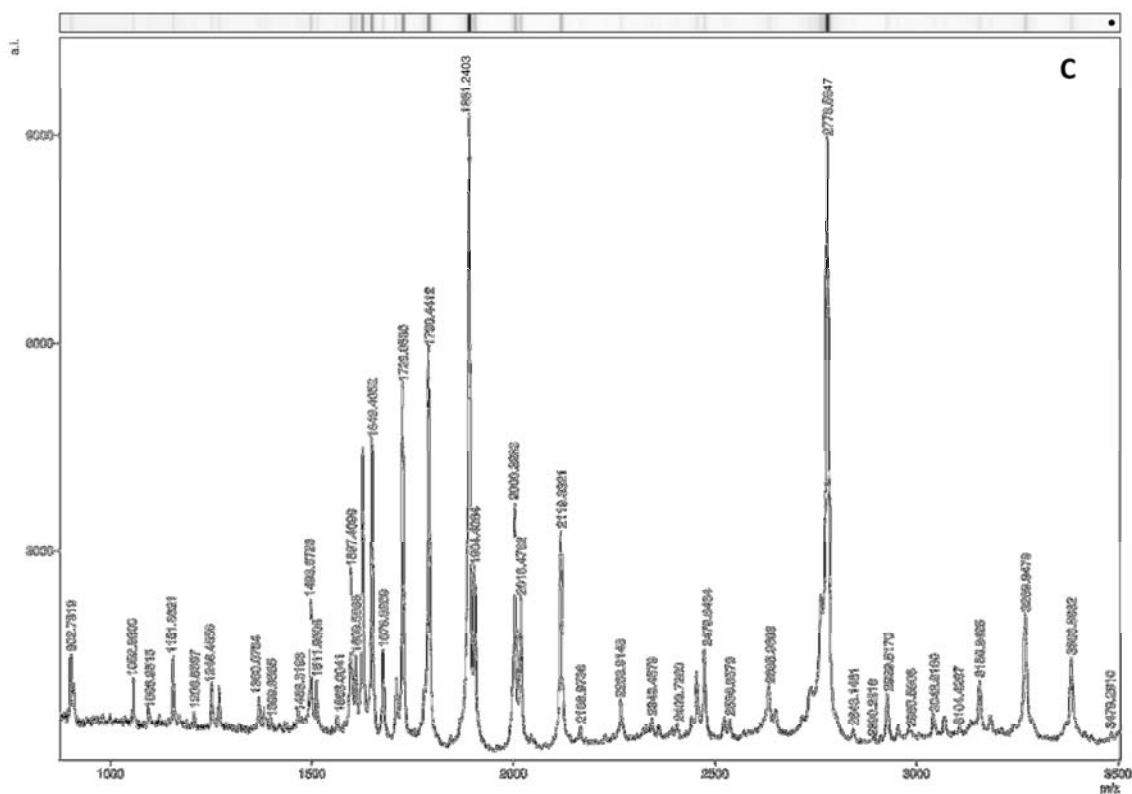
971

972



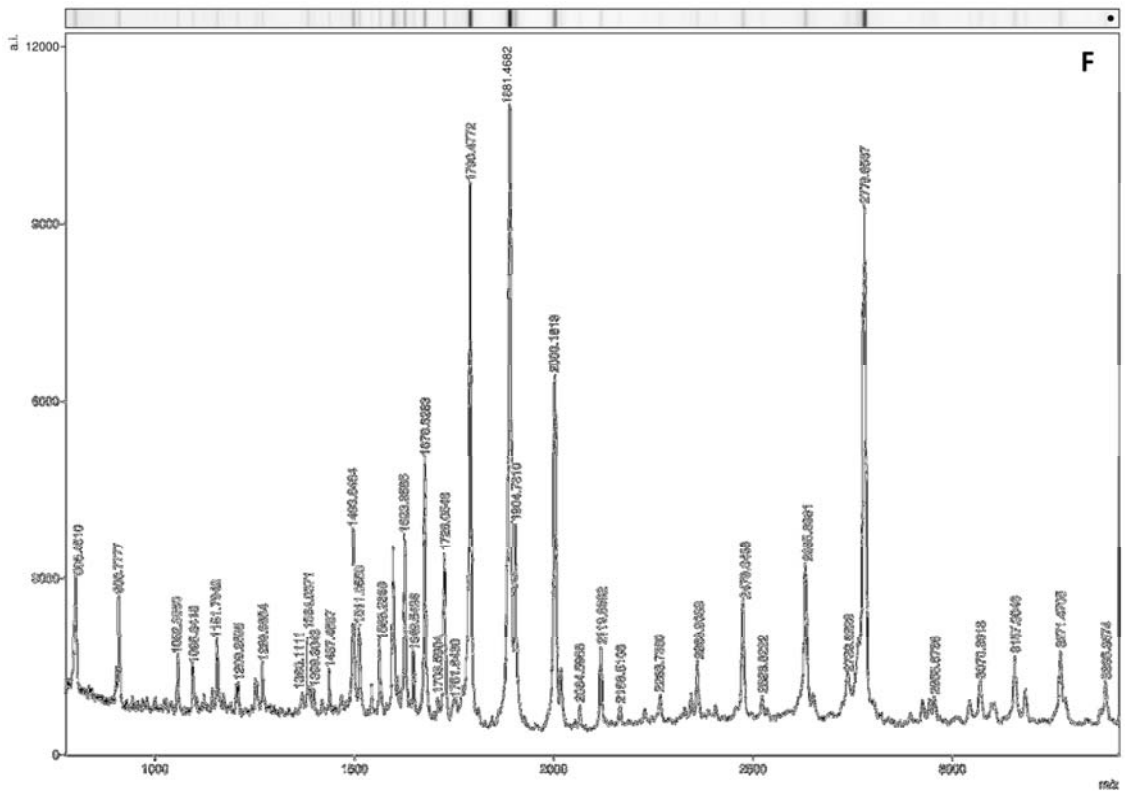
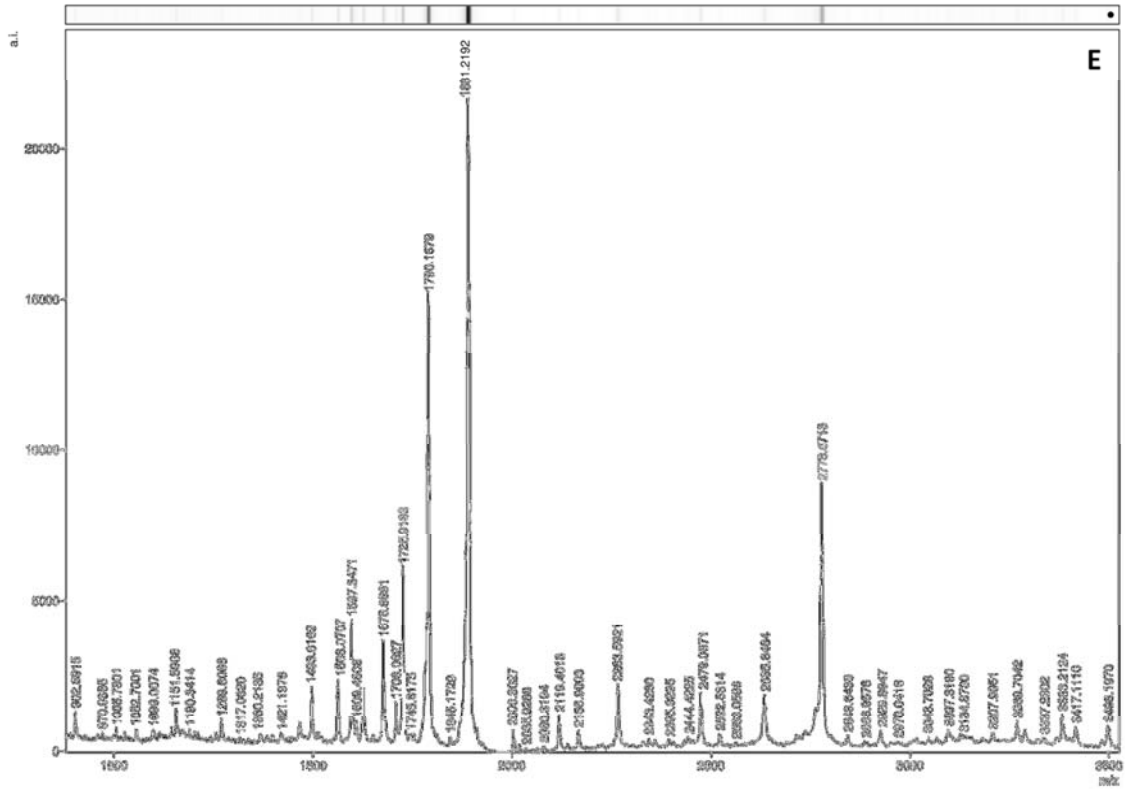
980
981
982

Figure 4



983
984
985
986

987 **Figure 5**
988

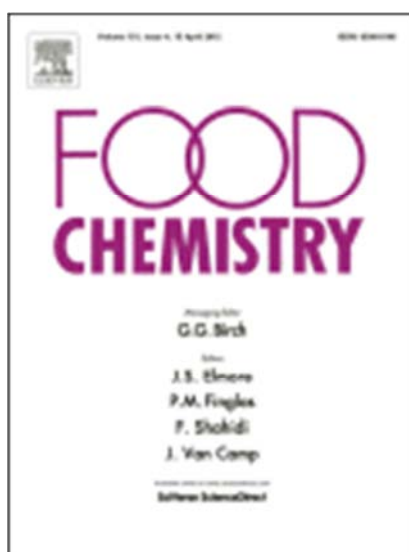


989
990

991

CAPÍTULO IV

Artigo Submetido à Revista:



1 **Can Artisanal “Coalho” Cheese From Brazilian Northeastern Be Used as**
2 **Functional Food?**

3

4

5 Silva, R.A.^{2,3}; Lima, M. S. F.³; Viana, J.B.M.²; Bezerra, V.S.^{2,3}; Pimentel, M.C.B.^{1,2};
6 Porto, A.L.F.^{2,3}; Cavalcanti, M.T.H.^{2,3}; Lima Filho, J.L.^{1,2*}

7

8 ¹ Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof.
9 Moraes Rego,1235, Cidade Universitária, 50670-901- Recife, Pernambuco - Brazil.

10

11 ²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de
12 Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50780-901 -
13 Recife, Pernambuco - Brazil.

14

15 ³ LABTECBIO/ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal
16 Rural de Pernambuco-UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-
17 900 - Recife, Pernambuco - Brazil.

18

19

20 *Author for correspondence: José Luiz de Lima Filho,

21 joseluiz60@mac.com Tel.: 55 81 2126 8484; fax 55 81 2126 8485

22

23

24

25

1 **Highlights**

2

3 • The bioactive properties of the Artisanal “Coalho” Cheese from Brazil Northeastern
4 were reported for the first time.

5 • It has a high degree of proteolysis with average 65 peptides. Range from 800 to 3500
6 Da.

7 • The peptides extract from cheeses showed zinc-binding, antimicrobial and antioxidant
8 activities.

9 • Peptides extracts showed antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*,
10 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **ABSTRACT**

2

3 Artisanal “Coalho” cheese was investigated as a functional food. Cheese samples from
4 six towns of the Agreste of Pernambuco State-Brazil were evaluated for peptide profile
5 and analyze the bioactivity as antioxidant potential, zinc-binding and microbial activity.
6 As regard to antioxidant potential, all peptides extracts of cheeses showed high
7 antioxidant activity, with maxima TEAC of $2223 \pm 10.10 \mu\text{M}$ ($91.1 \pm 0.43\%$ inhibition)
8 for cheese from Correntes town with peptide concentration for IC_{50} of 7mg/mL ($21 \mu\text{g}$
9 of peptide) and minimum of $1895.6 \pm 17 \mu\text{M}$ ($75.92 \pm 0.7\%$ inhibition) for cheese of
10 São Bento do Una City, with IC_{50} of 10.5 mg/mL ($31.5 \mu\text{g}$ of peptide). It also presented
11 zinc-binding activity between $75.47 \pm 0.5\%$ and $61.67 \pm 0.65\%$ of bind, and
12 antimicrobial activity against bacterias *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*,
13 *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. It is suggested that still has a this cheese
14 potential as a functional food

15

16 **Keywords:**

17 Functional food; Artisanal “Coalho” cheese; bioactive peptides; MALDI-ToF.

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **1. Introduction**

2

3 Consumers are increasingly interested in the health benefits of foods and have
4 begun to look beyond the basic nutritional benefits to the potential disease prevention
5 and health enhancing same compounds presented in many foods. This interest combined
6 with a more widespread understanding of how diet affects disease, rising health-care
7 costs and an aging population are driving a growing and robust market for functional
8 foods and natural health products. These foods represent an important growth category
9 for the commercial sector in many countries around the world (Sibbel, 2007).

10 Functional foods are closely related to health maintenance and preventive
11 medical care. The term was first introduced in Japan during the 1980s when the
12 government financed a national research project on the implications of medical sciences
13 for diet, in order to guarantee good health conditions for the older population (Arias-
14 Aranda & Romerosa-Martínez, 2010). Most experts agree on the following definition:
15 “A food can be regarded as functional if it is satisfactorily demonstrated to affect
16 beneficially one or more target functions in the body, beyond adequate nutritional
17 effects, in a way that is relevant to either improved state of health and well-being and/or
18 reduction of disease risk”. This definition was included in the EC Project FUFUSE
19 Consensus Document of 1999 (Arias-Aranda & Romerosa-Martínez, 2010).

20 The Artisanal “Coalho” cheese is a product typically Northeast and very
21 popular, widely consumed by local population, and around Brazil. Its main features are
22 the slightly salty flavor and slightly acid, and its resistance to heat without melting,
23 allowing make the popular “roast cheese”. It is produced primarily in the states of
24 Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte and Paraíba. This cheese has considerable

1 input in the economy, being significant in the formation of milk producers income,
2 especially those who do not have access to processing plants.

3 Over the past two decades increasing in scientific and industrial interest it has
4 been focused on the biological properties of milk proteins (80% casein), which possess
5 additional physiological effects due to the numerous bioactive peptides that are
6 encrypted within intact proteins (Korhonen & Pihlanto, 2006). During cheese
7 manufacturing and ripening, proteinases from diverse origin, degrades caseins (α 1-,
8 α 2- β and κ) releasing peptides of different sizes. Those peptides, once released, exhibit
9 different activities affecting the digestive, cardiovascular, immune and nervous systems
10 (Foltz, Van Buren, Klaffke, & Duchateau, 2009; Korhonen & Pihlanto, 2006)

11 The steady increase in life expectancy, the desire of older people for the
12 improved quality of their later lives, and the increasing cost of healthcare are the main
13 reasons that explain why there is an increasing demand for functional foods in the
14 market designed to confer health benefits. Then, the aim of the present study was to
15 investigate the potential bioactive of “Coalho” Cheese, as antioxidant, antimicrobial,
16 zinc-binding and antihypertensive activities. Suggesting their use as functional food.

17

18 **2. Materials and Methods**

19

20 *2.1. Materials*

21

22 Samples of artisanal “Coalho” cheeses were collected, directly from producers
23 after its manufacture, in the following towns of Agreste of Pernambuco State-
24 Brazil: Arcoverde, Capoeiras, Cachoeirinha, Correntes, São Bento do Una and
25 Venturosa. Samples were collected in sterile plastic bags, identified and immediately

1 transported to the laboratory, and kept at 10 °C until the time of analysis. The
2 production process of artisanal “Coalho” cheese was performed according to the
3 flowchart shown in the Figure 1. It was used animal industrial rennet (Chymosin) to
4 obtain the initial curd for cheeses. All chemicals were of analytical grade.

5

6 INSERT FIGURE 1 HERE

7

8 *2.2. Extraction of Water-Soluble Peptides*

9

10 Each cheese sample was homogenized with water (1:2 w/v) at 1000 rpm for 5
11 minutes in a Nissei AM-8 Homogenizer. The homogenate was centrifuged three times
12 at 8.000 xg for 30 minutes at 4 °C, the precipitate was discarded and the final
13 supernatant (water soluble peptides - WSP) was freeze-dried and stored at – 20 °C.

14

15 *2.3. Protein determination*

16

17 Protein concentration was measured by Folin-phenol method (Lowry,
18 Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) using bovine serum albumin as standard.

19

20 *2.4. Peptide profile of WSP in MALDI-ToF mass spectrometry analysis*

21

22 This analysis was performed to observe the peptide profile of the cheese
23 samples, once the bioactivity of peptides derived from cheese originated from the
24 fragmentation of casein from milk during cheese manufacturing.

1 This study was carried out in system Ettan MALDI-ToF-Pro (Amersham
2 Biosciences) equipped with a quadratic reflectron field and timed ion gate. The
3 acquisition of intact peptides was performed in linear mode with positive ionization,
4 rejection of mass 500 m/z, velocity of 8 shots/sec, the ion accelerating potential of 20
5 kV, 256 shots were collected from each spectrum. The soluble peptides was purified by
6 C18 Zip Tips and were mixed with 150 μ L of 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid, followed
7 1 μ L from this mixture was mixed with matrix solution 4-HCCA (α -cyano-4-hydroxy-
8 cinnamic acid in 50% v/v acetonitrile containing 0.1% v/v trifluoroacetic acid) in the
9 proportion of 1:1. From the last mixture, 0.3 μ L were applied in each four different
10 spots on a sample slide tray and allowed to dry at room temperature (23-25 $^{\circ}$ C). The
11 slide was inserted into the mass spectrometer to obtain spectra. Calibration of the time-
12 to-mass scale was performed using two external standard peptides (ile7AngIII,
13 Bradicinyn M+H 897.531, monoisotopic, and hACTH 18-39, M+H 2465.191,
14 monoisotopic).

15

16 *2.5. Activity Antioxidant Determination by 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)- 6-*
17 *sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity*

18

19 The method used was as described by Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala,
20 Yang, and Rice-Evans (1999), using the ABTS assay, which involves the generation of
21 ABTS radical chromophore by the oxidation of ABTS with potassium persulfate. It is
22 applicable for both hydrophilic and lipophilic compounds. The ABTS radical cation
23 (ABTS $^{\bullet+}$) was produced by reacting 7 mM ABTS stock solution with 140 mM
24 potassium persulfate (final concentration), and allowing the mixture to stand in the dark
25 at room temperature for 12–16 hour (the time required for formation of the radical)

1 before use. For the assay, the ABTS⁺⁺ solution was diluted with ethanol to an
2 absorbance of 0.7 (± 0.02) at 734 nm. 30 μ L of water soluble peptide extract samples
3 (3.5, 7.0, 10.5, 15 and 17.5 mg/mL) was mixed with 3 mL diluted ABTS⁺⁺ solution. The
4 absorbance at 734 nm was measured taken at different times (6, 30, 60, 90, 150 and 180
5 minutes). Appropriate solvent blanks were run in each assay. All determinations were
6 carried out in triplicate. TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic
7 acid) was also used as a reference standard. The inhibition percentage was calculated
8 and plotted as a function of the reference antioxidant concentration (TROLOX),
9 expressed in TROLOX equivalent antioxidant capacity (TEAC, μ M).

10

11 *2.6. Zinc-binding activity*

12

13 Samples of Artisanal “Coalho” cheese were used for determining the zinc-
14 binding activity. Solutions of zinc chloride ($ZnCl_2$) at concentration 1 mg/mL prepared
15 in sodium phosphate buffer (100 mM; pH 7.0) were added to the water soluble peptide
16 extracts (30 mg/mL) and incubated for 60 minutes in a 36 °C water bath, according to
17 the method proposed by Dashper, O’Brien-Simpson, Cross, Paolini, Hoffmann,
18 Catmull, et al. (2005).

19 The methodology used for digestion of the samples was recommended by the
20 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2000). Sample 100 mg was
21 calcined in a muffle furnace (500 °C) for 3 hours, until a constant weight was obtained.
22 The white ash was used to quantify the concentration of zinc in the samples by using
23 optical emission spectrometer-inductively coupled plasma (ICP-OES) at an absorbance
24 of 213.9 nm. The zinc-binding activity was expressed based on the percentage of zinc-
25 binding to the peptide extract from “Coalho” cheese.

1 2.7. Determination of antimicrobial activity

2

3 Water soluble peptide extracts was prepared in sterile distilled water at final
4 concentration of 50 mg/mL. Then this solution was centrifuged for 10 minutes at 1000
5 xg, and the supernatant was used for the antimicrobial activity assay.

6 The micro-organisms were selected from the standard strains according to the
7 National Committees for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), Gram positive
8 bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633,
9 *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, and Gram negative bacteria *Pseudomonas*
10 *aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 and *Escherichia coli*
11 ATCC 25922. Pre inoculum was prepared in TSB (Tryptone Soje Broth) and incubated
12 at 37 °C for 18-24 hours. The 0.5 McFarland standards was prepared and used to
13 approximate the concentration of (1.5×10^8 cfu/ml). All experiments were carried out in
14 a 96-well plate (NUNC), where each one received the inoculum, the liquid culture
15 medium broth TSB (Acumedia) and solutions of the water soluble peptides, with the
16 final volume of 100 µL (NCCLS, 2003), a control peptide composed only of extracts
17 and culture medium was also included. The microplates were then incubated at 37 °C
18 for 18-24 hours. The detection of antimicrobial activity was assessed by cell viability
19 using the commercial kit - resazurin Cell Viability Assay Kit, Biotium, Inc[®]. After the
20 incubation period 30 µl resazurin solution was added to each well for analysis
21 (Palomino, Martin, Camacho, Guerra, Swings, & Portaels, 2002). The plate was
22 reincubated for 30 min, and was analyzed by staining. The pink color or colorless
23 indicates growth of bacteria, the purple color or blue color indicates inhibition of
24 growth.

25

1 3. Results and Discussion

2

3 Proteolysis is the most complex of all the primary events during the ripening of
4 cheese, which results in the formation of various peptides. These peptides not only
5 contribute towards the development of flavor and texture in the ripened cheese but also
6 show a substantial bioactivity (Saito, Nakamura, Kitazawa, Kawai, & Itoh, 2000).
7 Figure 2 shows the peptide profile of the Artisanal “Coalho” cheeses evaluated, because
8 these peptides are the main agent responsible for the bioactivity of cheeses. The cheeses
9 had a high number of peptides, with their molecular weight ranging from 800 to 3500
10 Da. Cheese from Arcoverde presented 67 peptides, Capoeiras 57, Cachoeirinha 70,
11 Correntes 71, São Bento do Una 72 e Venturosa 57 peptides. Some of these peptides
12 are present in various types of cheeses such as, Cheddar, Swiss, Edam, Cooleeney,
13 Camembert, Parmigiano–Reggiano, Port du Salut, Cheddar (young), smeared Cheddar
14 and Gruyere.

15

16 INSERT FIGURE 2 HERE

17

18 3.1. Antioxidant activity of Artisanal “Coalho” cheese

19

20 The scavenging activity was determined by the ABTS⁺ radical method. The
21 Figure 3 show that all artisanal “Coalho” cheeses showed antioxidant activity as a
22 function of time. The cheese from Correntes town corresponded to greater antioxidant
23 capacity with $91.1 \pm 0.43\%$ in 180 minutes, equivalent to an TEAC of $2221 \pm 10.18 \mu\text{M}$
24 TROLOX. The “Coalho” cheese from São Bento do Una City showed the lowest
25 activity ($75.92 \pm 0.7\%$) in 180 minutes, corresponding the TEAC of $1895.6 \pm 17.6 \mu\text{M}$

1 TROLOX. It was also observed that during the first 30 min all cheeses except one from
2 São Bento do Una ($44.88 \pm 1.4\%$) already reach the IC_{50} . Up to 90 minutes was
3 obtained an average activity of $76.48 \pm 6.48 \%$ corresponding to TEAC of $1852.29 \pm$
4 $140.93 \mu\text{M}$ TROLOX, while the range of 90 to 180 minutes had only an average
5 increase of $8.37 \pm 2.6 \%$ in the antioxidant activity of Artisanal “Coalho” cheese.

6

7 INSERT FIGURE 3 HERE

8

9 The effect of peptide concentrations on the ABTS+ scavenging activity was
10 analyzed. Figure 4 show that the antioxidant activity of cheese curd increases with
11 increasing concentration of peptides, where the highest concentration (17 mg/mL) the
12 “Coalho” cheeses showed activity of: Arcoverde ($76.27 \pm 0.55\%$); Cachoeirinha (76.83
13 $\pm 0.14 \%$); Capoeiras ($73.2 \pm 0.14\%$); Correntes ($84.23 \pm 0.6\%$); São Bento do Una
14 ($66.27 \pm 1.24\%$) and Venturosa ($75.1 \pm 1.98\%$), with TEAC of 1868 ± 13.35 ; $1798 \pm$
15 4.37 ; 2052 ± 13.3 ; 1610 ± 30 ; $1827 \pm 49.51 \mu\text{M}$ TROLOX respectively, where the
16 highest activity was again for the cheese from Correntes town and the smallest for the
17 São Bento do Una town. Other relevant data was that the concentration of 7mg/mL (21
18 μg of peptide) in all Artisanal “Coalho” cheeses reached the IC_{50} except for the cheese
19 from São Bento do Una town ($42.2 \pm 1.57\%$).

20

21 INSERT FIGURE 4 HERE

22

23 Our results are similar to that obtained by Zulueta, Esteve, and Frígola (2009)
24 that compared orange juice and milk using ABTS⁺ method. The results showed that the
25 orange juice quickly inhibited the ABTS+ radical, with the inhibition percentage

1 remaining constant with time, whereas the milk had a low inhibition percentage at the
2 first time, gradually increasing and reaching an antioxidant capacity value similar to that
3 of the juice. They were better than one obtained by Gupta, Mann, Kumar, and Sangwan
4 (2009) who found values of 16.6 and 9.76 μM TROLOX for antioxidant activity of
5 cheese in Cheddar cheese manufactured with adjunct cultures *Lactobacillus casei* ssp.
6 *casei* 300 and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 22 respectively.

7 Comparing the TEAC values of Artisanal “Coalho” cheese with those found in
8 the literature, which indicates that antioxidant capacity is comparable to some wines and
9 the standard antioxidants such BHA (3-tert-butyl-4-hydroxynisole) who presented
10 TEAC in order 2430 μM TROLOX (Contreras, Hernández-Ledesma, Amigo, Martín-
11 Álvarez, & Recio, 2011), α -tocopherol and vitamin C greater than that presented 970
12 and 990 μM TROLOX, respectively (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, &
13 Milner, 1993).

14 Milk fermentation has been described as a strategy to release antioxidative
15 peptides from caseins. Some authors attribute the main antioxidant capacity of milk to
16 the casein fraction. According to Gupta, Mann, Kumar, and Sangwan (2009) histidine
17 and proline have been described as the most important residues in the lipoprotein
18 peroxidation inhibitory activity of peptides. Seven of the eight peptides identified in the
19 highest antioxidative fraction contained at least one proline residue, and six of them had
20 more than two proline residues. The high content of proline peptides could determine
21 the antioxidant activity found in this fraction. Tyrosine and tryptophan also showed
22 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radical scavenging capacity. The properties of these amino acids may be
23 explained by the special capability of phenolic and indol groups to serve as hydrogen
24 donors. The presence of Leucine residues in the peptide sequence, seem to play an

1 important role in their antioxidant and ACE-inhibitory activity (Alemán, Giménez,
2 Pérez-Santin, Gómez-Guillén, & Montero, 2011).

3 Free radical scavenging activity of an isolated 1 kDa peptide from a peptic
4 hydrolysate of casein that possessed a primary structure of Tyr–Phe–Tyr–Pro–Glu–Leu
5 (Suetsuna, Ukeda, & Ochi, 2000) has also been reported. Pritchard, Phillips, and
6 Kailasapathy (2010) showed that fractions peptide extracts from three commercial
7 Australian Cheddar cheeses exhibit antimicrobial, antihypertensive and antioxidant
8 properties, and extent of antioxidant activity of water soluble Cheddar cheese extracts is
9 dependent on the ripening stage of the cheese (Gupta, Mann, Kumar, & Sangwan,
10 2009). Hernandez-Ledesma, Davalos, Bartolome, and Amigo (2005) found that the
11 phenolic and indolic groups of Tryptophan and Tyrosine in milk had a special ability to
12 act as hydrogen donors, being responsible for the antioxidant capacity shown by these
13 amino acids. It is noteworthy the antioxidant activity of the peptides not only depends
14 on the amino acid composition but also on the sequence and configuration of the
15 peptides (Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto, & Nokihara, 1998). Casein peptide,
16 molecular mass about 3 kDa, have been shown to possess strong antioxidant activity by
17 using the β -carotene bleaching method, and they also showed scavenging activity
18 against radicals such as superoxide, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and
19 hydroxyl (Sakanaka, Tachibana, Ishihara, & Juneja, 2005). The peptides from artisanal
20 “Coalho” cheeses also show in this same range.

21 These antioxidant peptides present in the food system play a vital role in the
22 maintenance of antioxidant defense systems by preventing the formation of free radicals
23 or scavenging free radicals and active oxygen species, which induce oxidative damage
24 to biomolecules and cause ageing, cancer, heart diseases, stroke and arteriosclerosis, etc.
25 So the Artisanal “Coalho” cheese would be a great natural alternative for health benefits

1 3.2. Zinc-binding activity

2

3 All Artisanal “Coalho” cheeses studied showed zinc-binding activity greater
4 than 50% (Figure 5). The highest binding percentage was for cheese from Correntes
5 town with 75.47 ± 0.5 % and lower for cheese from Capoeiras town with 61.7 ± 0.65 %.
6 This result is of great importance, because it shows that the “Coalho” cheese besides
7 having other properties that can increase the bioavailability of zinc in the body, once
8 intestinal absorption of zinc is affected by a great number of dietary factors, which
9 include proteins, calcium, and metal-complexing, and this mineral plays a key role in
10 the function of several enzymes, participates in cell division, genetic expression,
11 physiological processes like growth and development and genetic transcription.

12

13 INSERT FIGURE 5 HERE

14

15 Phosphorylated peptides encrypted in a α s1-, α s2- and β -casein which may form
16 soluble complexes with minerals such as calcium, iron and zinc at intestinal pH,
17 modulating their bioavailability. These peptides, which act as mineral solubilizers
18 and/or carriers, are known as caseinophosphopeptides (CPPs) and can be released by in
19 vitro or in vivo enzymatic digestion of dairy products or during their processing (Clare
20 & Swaisgood, 2000; Meisel & FitzGerald, 2003).

21

22 Many CPPs contain high polar acidic sequences of three phosphoserines
23 followed by two glutamic acid residues (SpSpSpEE), which are the binding sites for
24 minerals. Moreover, there is evidence that amino acid residues upstream and
25 downstream of this region are also involved (Ferraretto, Gravaghi, Fiorilli, &
Tettamanti, 2003).

1 According to Harzer and Kauer (1982) as no zinc binds to dephosphorylated
2 casein the conclusion might be drawn that the bivalent zinc ion is complexed to casein
3 via its negatively charged phosphate groups. This would be in good agreement with the
4 fact that no zinc to bind casein could be observed in acid, where the phosphate residues
5 are most likely to occur in a charge free state.

6 Another important fact about the zinc-binding activity is that Artisanal “Coalho”
7 cheese showed that according to Sato, Noguchi, and Naito (1986) zinc binds weakly to
8 phosphoserine residues in CPPs, and this weak affinity is relevant to nutrition, as zinc
9 and other minerals can be released progressively in the intestinal lumen for absorption.
10 Thus allowing greater absorption of zinc.

11

12 3.3. Antimicrobial activity of Artisanal “Coalho” cheese

13

14 According to Table 1 we can see that the extract of water-soluble peptides in
15 Artisanal “Coalho” cheese showed antimicrobial activity. All cheese samples showed
16 antimicrobial properties for at least one bacteria analyzed, except the Correntes City.
17 The highest activities were for extracted peptides from cheeses of Cachoeirinha and
18 Venturosa cities, showing activity against bacterias *Enterococcus faecalis*, *Bacillus*
19 *subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

20

21 INSERT TABLE 1 HERE

22

23 Authors such as López-Expósito, Gómez-Ruiz, Amigo, and Recio (2006) affirm
24 that the majority of peptides derived from casein with antimicrobial activity are in the

1 range 3-50 aminoacids. Several of these peptides are in the range found in this work that
2 was 800 to 3500 Da.

3 Do not exist studies that have examined the antimicrobial activity of “Coalho”
4 cheese. Several authors have reported that various peptides derived from milk casein
5 with antimicrobial properties, such as, Casecidins, obtained through chymosin digestion
6 of α s1-casein which were intended for therapeutic use to treat infectious diseases owing
7 to their bactericidal activity against a wide range of Gram-positive bacteria of health
8 significance including staphylococci, *Sarcina spp.*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus*
9 *pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* (Clare & Swaisgood, 2000). Isracidin is
10 another antimicrobial peptide released by chymosin cleavage of bovine α S1-casein,
11 which consists in a 23-aminoacid-residue fragment of α S1-casein f(1-23). This cationic
12 peptide has been reported to be active in vitro against a broad spectrum of Gram-
13 positive and Gram-negative bacteria (Hayes, Ross, Fitzgerald, Hill, & Stanton, 2006).

14 Recently, Pritchard, Phillips, and Kailasapathy (2010) evaluating the microbial
15 activity of peptide extracts of Australian Cheddar cheeses, found activity against
16 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*. Also Italian cheese water-soluble peptides have
17 shown high antimicrobial activity against various bacteria including *Escherichia coli*,
18 *Bacillus megaterium*, *Listeria innocua*, and *Staphylococcus aureus* (Rizzello, Losito,
19 Gobbetti, Carbonara, De Bari, & Zambonin, 2005). Lastly, the antimicrobial peptides
20 from “Coalho” cheese and other cheeses present the advantage of being derived from a
21 harmless source, and may have therefore a potential for use in medicine or the food
22 industry.

23

24

25

1 **4. Conclusions**

2

3 In conclusion, these findings have shown that all Artisanal “Coalho” cheese
4 peptide extracts exhibited bioactivity. The peptides extracted from cheese, have shown
5 the strongest activity in all three bioactive properties analyzed. Although it is difficult to
6 compare the antioxidant capacity with the data existing in the literature due to the
7 diversity of methodologies used, “Coalho” cheese seems to be a good potential source
8 of antioxidant peptides. Can increase the bioavailability of zinc in the body, and in
9 relation to their antimicrobial activity, could possibly be used as reduce contamination
10 of the food itself. “Coalho” cheese peptides represent a source of health-enhancing
11 components that may be incorporated in functional foods, pharmaceutical preparations
12 and nutraceutical purposes.

13

14 **Acknowledgments**

15

16 The authors thank the financial support of FACEPE (Fundação de Amparo à
17 Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), LIKA (Laboratório de
18 Imunopatologia Keizo Asami), UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) and
19 UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco).

20

21 **Conflict of interest**

22

23 The authors declare that they have no conflict of interest.

24

25

1 **References**

2

3 Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P.
4 (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory
5 activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food*
6 *Chemistry*, 125(2), 334-341.

7 AOAC. (2000). *Official Methodos of Analysis, 17.th Edtion*, vol.1.

8 Arias-Aranda, D., & Romerosa-Martínez, M. M. (2010). Innovation in the functional
9 foods industry in a peripheral region of the European Union: Andalusia (Spain).
10 *Food Policy*, 35(3), 240-246.

11 Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998).
12 Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from
13 Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of*
14 *Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53.

15 Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus.
16 *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195.

17 Contreras, M. d. M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., &
18 Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein
19 concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology.
20 *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 9-15.

21 Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Cross, K. J., Paolini, R. A., Hoffmann, B.,
22 Catmull, D. V., Malkoski, M., & Reynolds, E. C. (2005). Divalent metal cations
23 increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin. *Antimicrobial Agents*
24 *and Chemotherapy*, 49, 2322-2328.

- 1 Ferraretto, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A., & Tettamanti, G. (2003). Casein-derived
2 bioactive phosphopeptides: Role of phosphorylation and primary structure in
3 promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. *FEBS Letters*, 551(1-3), 92-98.
- 4 Foltz, M., Van Buren, L., Klaffke, W., & Duchateau, G. S. M. J. E. (2009). Modeling of
5 the relationship between dipeptide structure and dipeptide stability,
6 permeability, and ACE inhibitory activity. *Journal of Food Science*, 74(7),
7 H243-H251.
- 8 Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., & Sangwan, R. B. (2009). Antioxidant activity of
9 Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy*
10 *Technology*, 62(3), 339-347.
- 11 Harzer, G., & Kauer, H. (1982). Binding of zinc to casein. *American Journal of Clinical*
12 *Nutrition*, 35(5), 981-987.
- 13 Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Stanton, C. (2006). Casein-derived
14 antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026.
15 *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2260-2264.
- 16 Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., & Amigo, L. (2005). Preparation
17 of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -
18 Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of*
19 *Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- 20 Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality.
21 *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- 22 López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J. Á., Amigo, L., & Recio, I. (2006). Identification of
23 antibacterial peptides from ovine α s2-casein. *International Dairy Journal*, 16(9),
24 1072-1080.

- 1 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein
2 measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological*
3 *chemistry*, 193(1), 265-275.
- 4 Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins:
5 Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*,
6 9(16), 1289-1295.
- 7 Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A
8 novel method for measuring antioxidant capacity and its application to
9 monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84(4), 407-
10 412.
- 11 NCCLS. (2003). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.
12 Approved standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa.
- 13 Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002).
14 Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection
15 of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and*
16 *Chemotherapy*, 46(8), 2720-2722.
- 17 Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive
18 peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5),
19 1545-1548.
- 20 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).
21 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization
22 assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- 23 Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P.
24 G. (2005). Antibacterial Activities of Peptides from the Water-Soluble Extracts
25 of Italian Cheese Varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348-2360.

- 1 Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and
2 Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda
3 Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434-1440.
- 4 Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., & Juneja, L. R. (2005). Antioxidant
5 properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef
6 homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 464-468.
- 7 Sato, R., Noguchi, T., & Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhanced
8 calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of*
9 *Nutritional Science and Vitaminology*, 32, 67-76.
- 10 Sibbel, A. (2007). The sustainability of functional foods. *Social Science and Medicine*,
11 64(3), 554-561.
- 12 Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free
13 radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of*
14 *Nutritional Biochemistry*, 11(3), 128-131.
- 15 Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison
16 to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1),
17 310-316.
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1 **Figure Captions**

2

3 **Fig. 1.** Production flowchart of Artisanal “Coalho” cheese from Agreste region of
4 Pernambuco State - Brazil.

5

6 **Fig. 2.** Amount of peptides formed during the manufacture of Artisanal “Coalho”
7 cheese by mass spectrometry analyses (MALDI-ToF). Peptide molecular weight range
8 from 800 to 3500 Da. Producer Towns of cheeses: Arcoverde (ARC); Cachoeirinha
9 (CAC); Capoeiras (CAP); Correntes (COR); São Bento do Una (SBU) and Venturosa
10 (VEN).

11

12 **Fig. 3.** Effect of the time on antioxidant activity of water soluble peptides extracts from
13 Artisanal “Coalho” cheeses. Peptide concentration: 17 mg/ml. Standard deviations were
14 $\pm 2.0 \%$ (based on three replicates)

15

16 **Fig. 4.** Effect of concentration of water soluble peptides extracts from Artisanal
17 “Coalho” cheeses, on activity antioxidant in 90 min. Standard deviations were $\pm 3.0 \%$
18 (based on three replicates).

19

20 **Fig. 5.** Zinc-binding activity of water soluble peptides extracts from Artisanal “Coalho”
21 cheeses. Standard deviations were $\pm 0.65 \%$ (based on three replicates).

22

23

24

25

1 **Tables Legend**

2

3

4 **Table 1** Antimicrobial activity of water soluble peptide extracts from Artisanal

5 “Coalho” cheese.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

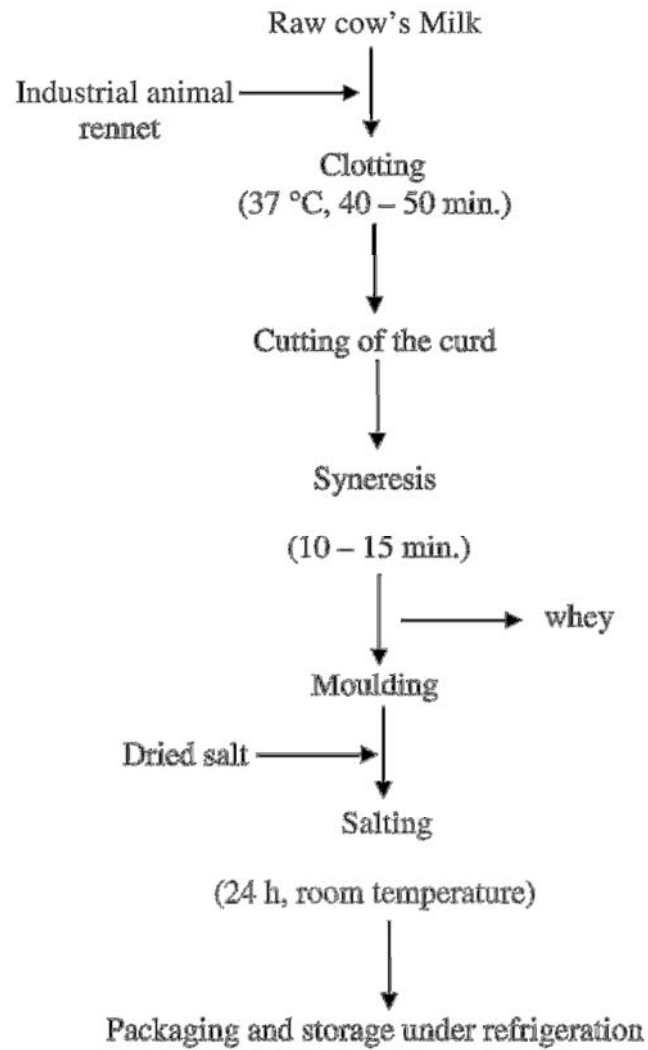
21

22

23

24

25

1 **Fig.1.**

1 **Fig.2.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

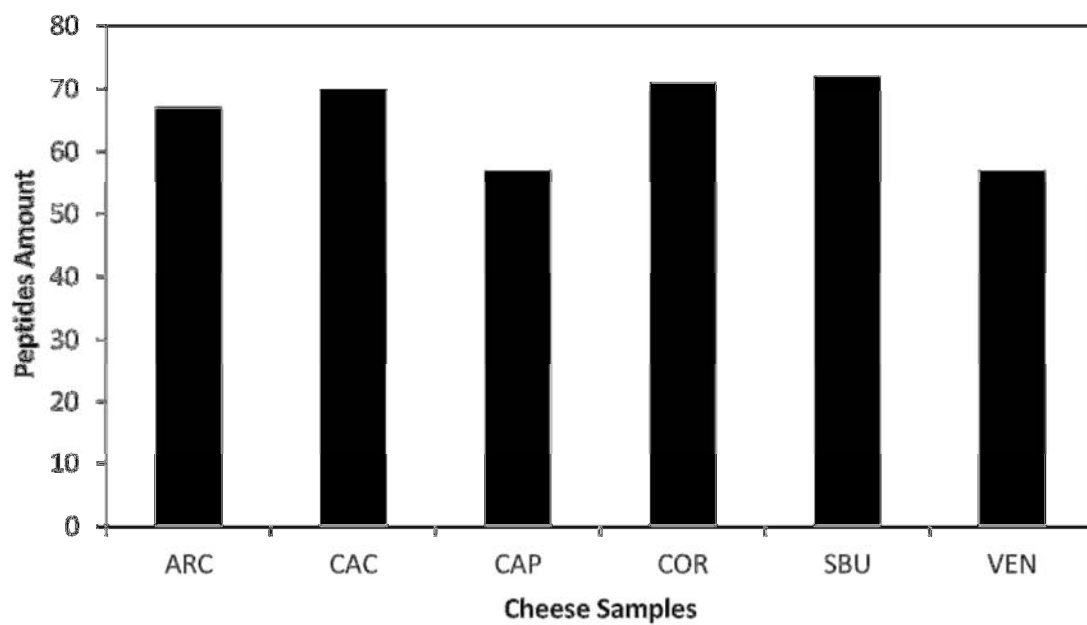
21

22

23

24

25



1 **Fig.3.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

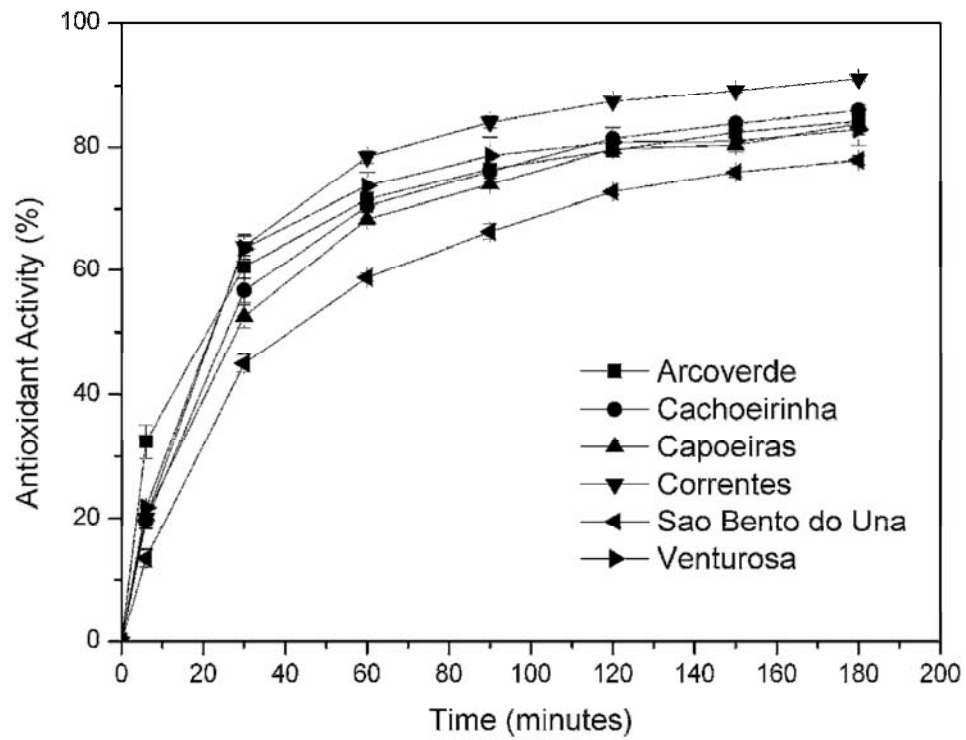
21

22

23

24

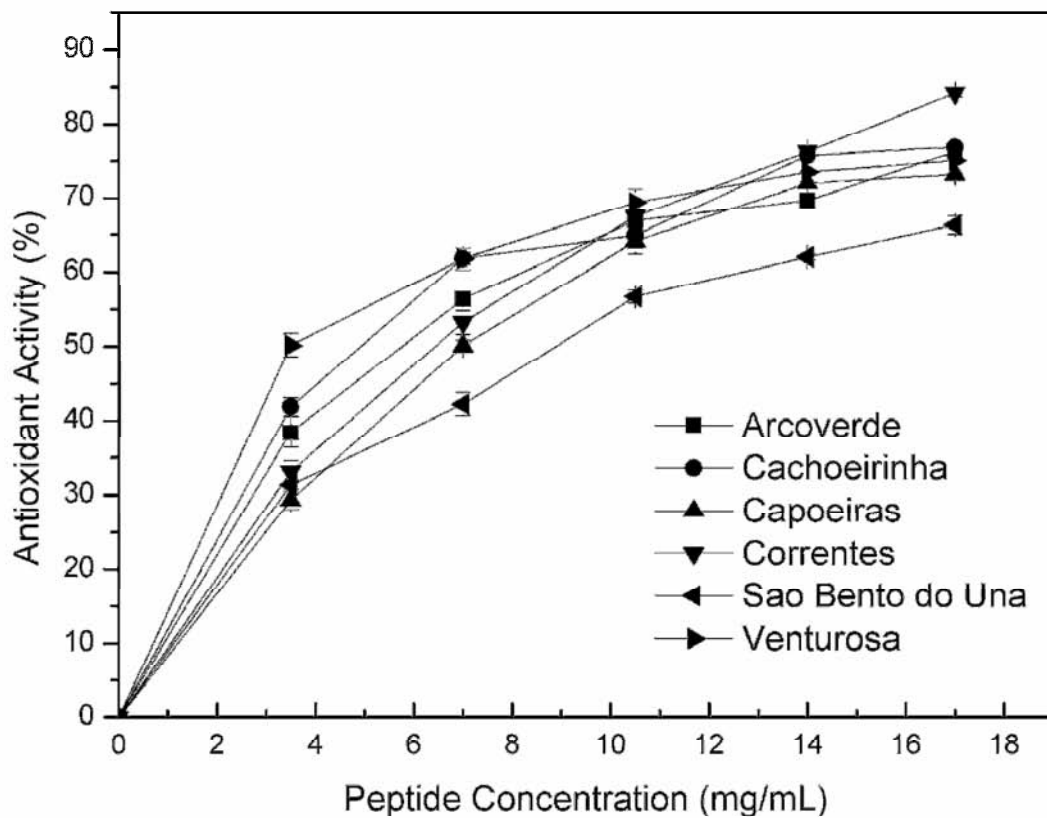
25



1 **Fig.4.**

2

3



21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 **Fig.5.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

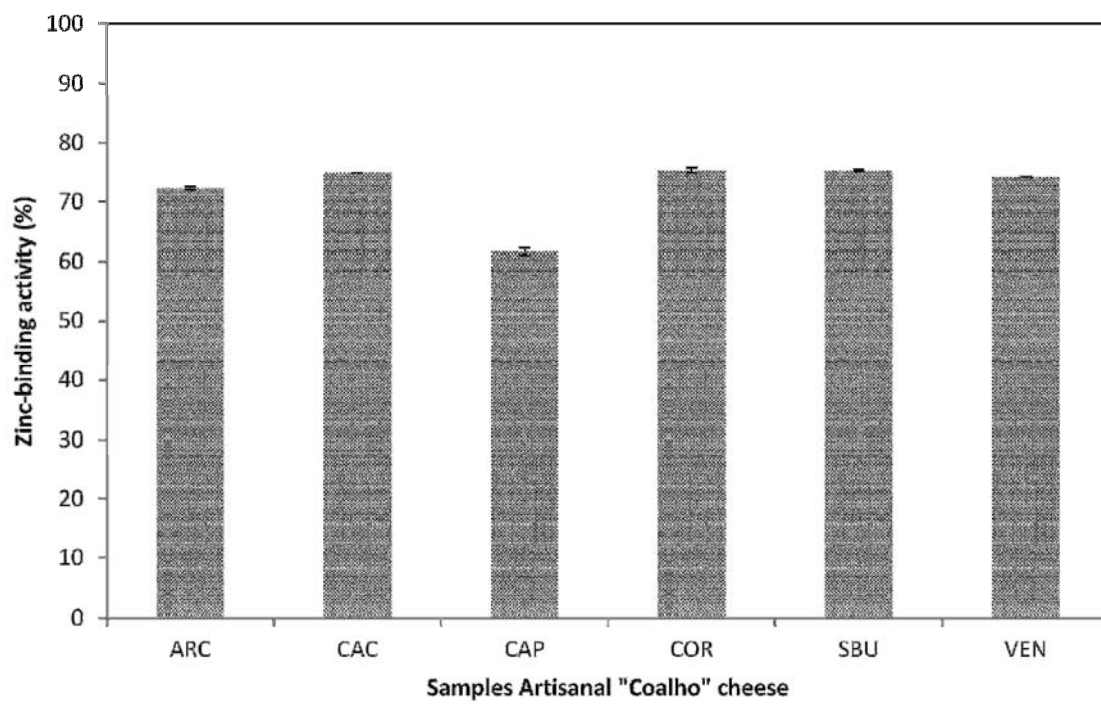
21

22

23

24

25



1 **Table 1**

2

3

4

Strains	Antimicrobial activity					
	ARC	CAC	CAP	COR	SBU	VEN
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057	+	+	+	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	+	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	-	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-	-

5

6 * Legend of producer towns of Artisanal “Coalho” Cheese: **Arcoverde (ARC); Capoeiras (CAP);**7 **Cachoeirinha (CAC); Correntes (COR); São Bento do Una (SBU); Venturosa (VEN).**

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS



Considerações Finais

Diante dos resultados promissores obtidos com um produto artesanal e regional de grande apelo cultural, tanto para os pernambucanos, quanto para os nordestinos de maneira geral e que vem ganhando espaço em todo território brasileiro, devemos valorizar cada vez mais esses alimentos que são marginalizados por serem preparados em processos manuais, e na maioria das vezes, por pessoas sem grandes conhecimentos técnicos de higiene e transmissão de doenças via alimentos.

Com os dados científicos relevantes apresentados neste trabalho, tais como a presença de um perfil peptídico, composto por peptídeos antioxidantes, antimicrobianos, carreador de minerais, além de um perfil bacteriano láctico diferenciado que muito contribui para as características organolépticas do produto analisado, assim como a atividade biológica encontrada.

Nós podemos afirmar que o queijo de Coalho produzido na região Agreste de Pernambuco tem expressiva importância na melhoria da saúde dos consumidores, desde que sejam cumpridas todas as etapas tecnológicas e sanitárias para garantir um alimento seguro e com todo o potencial.

Após o cumprimento da primeira etapa dos trabalhos científicos, temos ainda como metas futuras de trabalho, o isolamento, sequenciamento e síntese de cada peptídeo com atividade biológica relevante para a saúde do consumidor, sempre com o objetivo final de valorizar a cadeia produtiva local, a cadeia do leite, que é necessária para o crescimento sustentável da economia daquela região.

ANEXO I

Relatórios de Visita Técnica da 1ª coleta (29/02/2008 a 01/03/2008)

2.1 Relatório de visita técnica – Venturosa

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO LATICÍNIO LEITE NOBRE – VENTUROSA

Proprietário: Romildo

➤ **Procedimento para o fabrico do queijo de coalho:**

- **Chegada do leite:** às 06:55 hora chegou na unidade o leite oriundo do Sítio Barbado (35 litros). Um segundo “leite” chegou às **07:00 hora**, 409 litros. Às 07:35 chegou um 3º leite. O queijo que coletamos foi produzido com o 2º leite, recolhido da ordenha do sítio ao lado da unidade (proprietário: Aldo, Sr. Zuka).
 - **Teste de plataforma:** o teste foi realizado com Alizarol, usando um tipo de “pistola”. Eles dispõem também de uma máquina específica para o teste, que discrimina e quantifica a acidez do leite; a máquina não foi usada porque estava com defeito.
- OBS.: O leite passa por um tubo plástico até chegar no barril ou tanque onde se iniciará a produção do queijo. Nas duas extremidades há “toalha”.
- **Ponto de desnate:** eles desnatam 18 litros, para um barril plástico (redondo) de 460 L. Teor de 4%.
 - **Adição de cloreto de cálcio:** Tanilake = 30ml / 100L de leite
 - **Colocação do coalho:** adicionado às 07:10, 120 ml (Ha – la)
 - **Tempo para corte da massa:** 20 a 30 minutos. Não usam lira.
 - **Retirada do soro:** às 07:45 hora. Retiram com baldes, após a coalhada “baixar”; transferem-no para tonéis plásticos, tendo em cima um coador tipo peneira, de inox.
 - **Pré-prensagem e prensagem:** manual, em mesa de inox.
 - **Prensagem:** eles trabalham com “formas” de 350g, 1Kg e 1,5Kg.
 - **Tipo de salga:** depois de prensado, os queijos são colocados nas prateleiras, que já estão com sal; depois eles jogam sal por cima. Os funcionários não têm idéia de quanto põem de sal, é pelo “olhômetro”! o queijo permanece na prateleira 30 minutos.

OBS.: neste dia, a fabricação era do queijo insosso.

- **Tempo para resfriamento:** depois da salga, os queijos são colocados na câmara fria (do jeito que estava na prateleira). Permanece na câmara por 24 horas.
- **Temperatura para resfriamento:** 2° C, em câmara fria.
- **Tempo para embalagem:** a embalagem é feita depois que o queijo é resfriado, ou seja, no dia seguinte à fabricação.
- **Temperatura de estocagem:** 7° C.

➤ **Observações**

- Os funcionários usam touca, máscara descartáveis e fazem higienização das mãos (até o antebraço) com álcool (gel) 70%; os “visitantes” também têm usar touca e máscara.

- Os funcionários passam por capacitação através do SEBRAE.
- A unidade possui um bom fluxograma; há um espaço separado para guardar materiais de limpeza (baldes, sabão, etc.).
- Leite total: manhã = 3.000L; noite = 2.000L

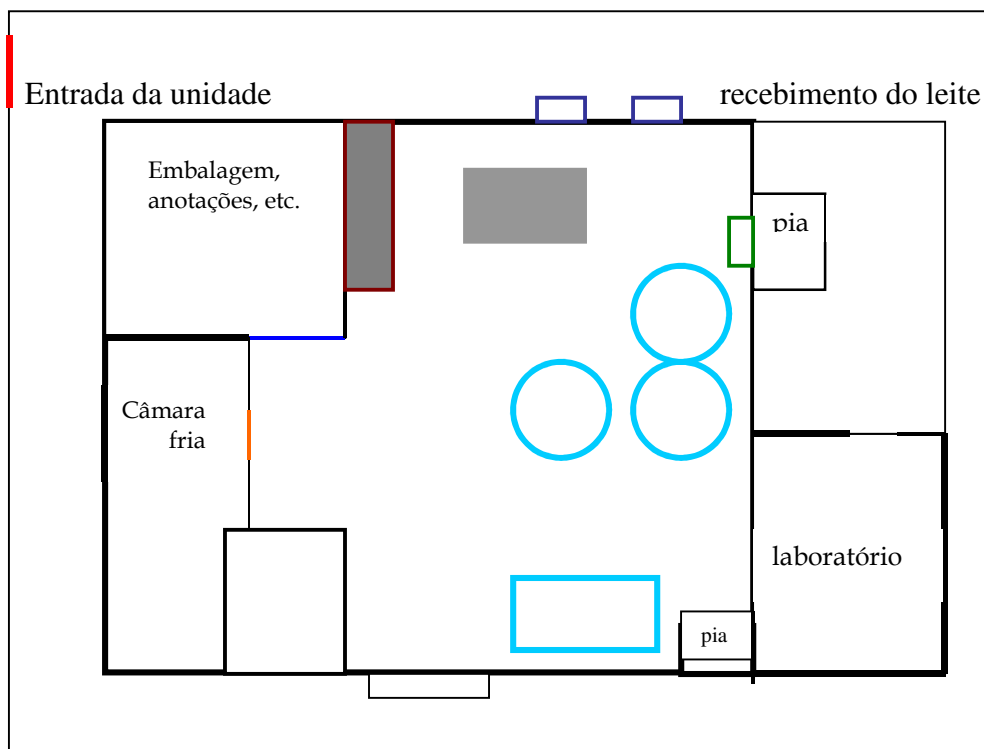
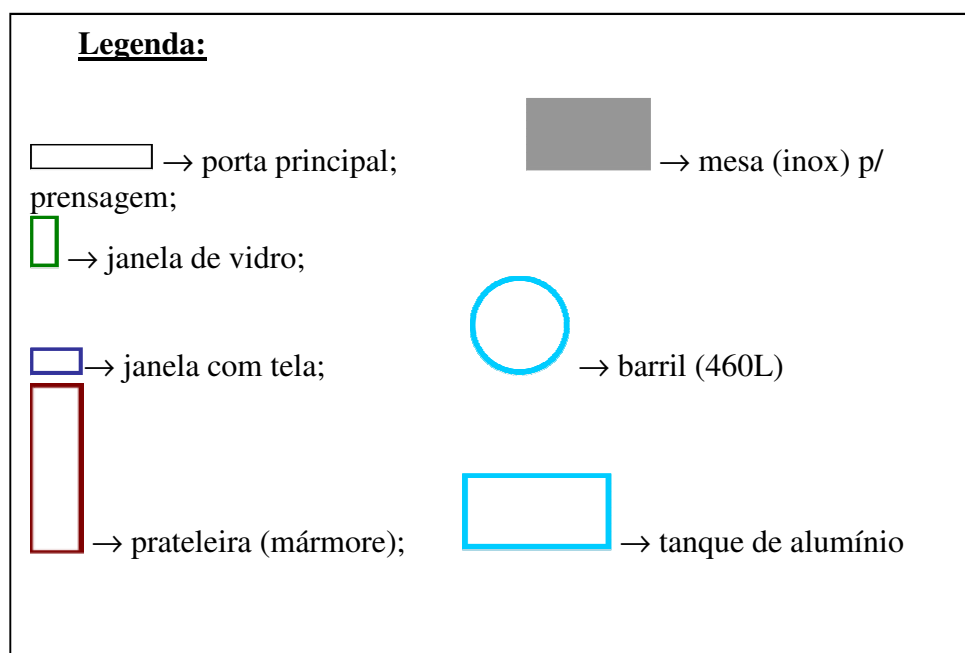


Figura 7. Esquema em diagrama da unidade de Venturosa visitada.



2.2 Relatório de visita técnica – Capoeiras

RESUMO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO DE CAPOEIRAS – Sítio Piado/PE

Data: 01/03/2008

Nome do Laticínio: Agenilda Silvestre de Pontes

Marca: Queijo de Coalho Tipo B Independência

Nome do proprietário: Agenilda Silvestre de Pontes

O leite chegou-se de vários locais, uma parte do próprio assentamento (1ª Hora de Chegada na Unidade - HCU: 7h:16) e as demais vem de duas propriedades, uma do senhor Eraldo e a outra do senhor Firmino (2º HCU: 8h:15 e a 3ª HCU: 8h:30). A quantidade do leite é de aproximadamente 600 L pela manhã e à tarde 250 L. Após, verificou-se a quantidade de leite de cada local, não fazendo-se o teste de lazarou, pois esse teste é realizado raramente. Além disso, não existe desnate no leite, nem a adição de Cloreto de Cálcio.

Em seguida, transferiu-se o leite para um coador coberto com um pano apropriado, localizado na parte interna da unidade produtora, onde o mesmo foi despejado num tanque com capacidade de 330 L. Assim, como a capacidade do tanque mostrou-se inferior a quantidade de leite recebida, separou-se este em outros compartimentos, no caso, em tonéis, até colocação total de leite. Logo após, colocou-se, no tanque e nos tonéis, o coalho a partir da mistura de 1 Kg de sal com 60 mL de coalho líquido (hora da colocação do coalho: 9h:00), e, após, esperou-se 40 minutos para coalhar. Passado esse tempo, fez-se o corte da massa e a mexedura, por cerca de 5 minutos cada. Depois desse procedimento, colocou-se uma tela fina na superfície do tanque para a retirada do soro (hora da retirada do soro: 9h: 45), sendo esse mesmo procedimento realizado com os tonéis contidos de leite. Convém ressaltar ainda, que parte do soro é separado para a fabricação de ricota, enquanto que a outra parte é destinada aos porcos.

Numa mesa de inox, coberta com um pano coador, colocou-se a massa do coalho, contendo-se ainda um pouco de soro, e côou-se até toda a sua retirada, fazendo-se uma pré-prensagem com as mãos. Após esse processo, colocou-se a massa do coalho nas formas de prensagem em inox com capacidade de 1 Kg cada forma, durante 20 minutos e, após, virou-se à massa durante esse mesmo tempo. Passado esse tempo, retirou-se a massa do coalho das formas de prensagem e colocou-se numas prateleiras para realização da salga. Esta foi feita colocando-se na massa uma determinada quantidade de sal na parte superior, deixando-se por cerca de 1 hora, e na parte inferior, deixando-se também por mais 1 hora.

Realizado esse procedimento, permanece-se 24 horas nas prateleiras, no qual lavou-se o queijo com água e embalou-se, num tempo de aproximadamente 5 min, onde seguiu-se para o resfriamento, neste caso um freezer, até a distribuição do produto final para o mercado.

2.3 Relatório de Visita Técnica – Correntes

UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO DE POÇO COMPRIDO – CORRENTES/PE Data: 29/02/2008

Pontos principais:

O leite chegou-se de diversos locais. Após essa chegada, realizou-se o teste de lazarou, onde, em seguida, o leite foi transferido para um coador coberto com um pano apropriado, localizado na parte interna da unidade produtora, onde o mesmo foi despejado num tanque. Realizou-se inicialmente o desnate, a partir da mistura de 500 L de leite, 200 L de leite desnatado e 300 L *in natura*. Logo em seguida, adicionou-se 300 mL de Cloreto de Cálcio.

Logo após, colocou-se, no tanque, o coalho (colocado por volta das 9h:50) a partir da mistura de 20 mL de Chy- Max extra, diluído em 200 mL de água, agitou-se e esperou-se 40 a 45 minutos para coalhar. Passado esse tempo, fez-se o corte da massa, com a 1ª lira com divisões na horizontal e 2ª lira com divisões na vertical, por cerca de 10 minutos. Após, essa homogenização, esperou-se 20 minutos para a 1ª mexedura, realizada durante um tempo de 10 minutos. Após, a massa descansou-se por mais 10 minutos, para a 2ª mexedura, cujo tempo foi de aproximadamente 5 minutos. Feito esse processo, colocaram-se dois baldes de água quente (choque térmico) com uma Temperatura ótima de 33 a 34 ° C e homogenizou-se, deixando-se descansar por 10 minutos. Depois, retirou-se o soro (hora: 11h:25 min), com baldes, e, em seguida, transferiu-se à massa para uma bacia, onde adicionou-se o sal, com cerca de ½ kg (ou 2 Kg de sal para 500 L), realizando-se uma pré-prensagem com as mãos.

Após esse processo, transferiu-se a massa do coalho para uma mesa de inox, onde colocou-se esta numas formas de prensagem também em inox com capacidade de 1 Kg cada forma, onde a massa foi prensada por cerca de 10 a 20 minutos. Após virou-se à massa do queijo deixando-a por mais 10 minutos. Logo após, tirou-se o queijo da forma e transferiu-se o para a mesa, onde se fez o acabamento nas partes laterais do queijo, e, em seguida, levou-se para a câmara de resfriamento numa Temperatura de 10°C, num tempo de 24 h, até ir para o mercado.

A embalagem é realizada após o resfriamento, num tempo de 24 h após o queijo pronto.

**REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS INSTALAÇÕES OBSERVADAS NO
MUNICÍPIO DE CORRENTES**



Figura 1. Recepção do leite na unidade fabril de Correntes visitada.



Figura 2. Recepção do leite na unidade fabril de Correntes visitada.



Figura 3. Entrada do laticínio na unidade fabril de Correntes visitada.



Figura 4. Corte manual da coalhada com lira.



Figura 5. Preparação da massa para colocar na prensa.



Figura 6. Colocação da massa na prensa.



Figura 7. Massa na prensa.



Figura 8. Queijo pronto para embalagem.

2.4 Relatório de Visita Técnica – São Bento do Uma

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO FAZENDA SANTO ANTÔNIO – SÃO BENTO

Proprietário: Ediel de Azevedo Gomes

➤ **Procedimento para o fabricação do queijo de coalho:**

- **Chegada do leite:** Pela fábrica estar na própria fazenda do produtor do queijo, o leite é retirado e tão logo levado para o processo de fabricação. A retirada do leite deu-se às 6h20min.
- **Teste de plataforma:** Quando o queijo era produzido para à venda, era realizado apenas o teste com Alizarol.
- **Adição de cloreto de cálcio:** O produtor não adicionava cloreto de cálcio na fabricação, todavia é um procedimento corriqueiro na produção industrializada.
- **Colocação do coalho:** O coalho foi adicionado às 6h25min.
- **Tempo para corte da massa:** O corte na massa foi feito às 7h30min, em seguida foi feita a mexedura.
 - **Ações Intermediárias:** Não houve ações intermediárias.
 - **Retirada do soro:** O soro foi retirado vertendo-o na pia às 8h10min. Na fabricação para vender, o soro era coado em peneira.
 - **Pré-prensagem e prensagem:** Por conseguinte foi feita a prensagem manual em forma de aço-inox, porém quando existia à venda do produto a prensagem era feita com pedra. 40 formas eram utilizadas.
 - **Prensagem:** O fabricante usava apenas formas de aço-inox de um quilograma.
- **Tipo de salga:** Na época de fabricação a salga era feita misturando-se o sal à massa, mas para o consumo doméstico a salga é feita em cima do queijo já prensado em um tempo de 1h. Misturando-se para vender o tempo era de 10 a 15 minutos. A quantidade por quilo de queijo é de aproximadamente 15-20 gramas.
 - **Tempo para resfriamento:** O tempo de resfriamento é de cerca de 1h de descanso depois levar à geladeira.
 - **Temperatura para resfriamento:** A temperatura de resfriamento na época de produção era em um freezer à 10°C. Para consumo doméstico a temperatura é de geladeira.
 - **Temperatura para resfriamento:** O tempo para embalar a peça de queijo é de aproximadamente 1h - 1h30min dependendo da consistência da peça. Se estiver bem

consistente pode ser embalada sem risco de partir, se não estiver tem que esperar mais um pouco até atingir a rigidez adequada.

- **Temperatura de estocagem:** Temperatura de 10°C.

Observações:

- O proprietário Ediel tem curso técnico em laticínios e produção.
- Sua retirada diária para à venda para o Laticício São Bento é de aproximadamente 500 litros/dia.
- O caminhão que passa para pegar o leite retirado para à venda, passa 4h depois da ordenha todos os dias o que acarreta a deterioração do leite. O proprietário comprou um silo específico para resfriamento do leite para sua conservação, porém como não atribuíram um valor mais elevado pelo litro do leite resfriado, que hoje está em R\$ 0,65/L, o proprietário vendeu o silo de resfriamento para “não deixar o dinheiro parado”.
- Utilização de touca e higienização das mãos.

**REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS INSTALAÇÕES OBSERVADAS NO
MUNICÍPIO DE SÃO BENTO DO UNA**



Figuras 9. Local de ordenha e alimentação do gado.



Figuras 10. Recipiente onde o leite é coalhado.



Figura 11 - Limpeza do material usado.



Figura 12 - Retirada do soro.



Figura 13 - Pré-prensagem



Figura 14 - Prensagem manual.



Figura 15 - Ajuda de peça de madeira.



Figura 16 - Prensagem finalizada.



Figura 17 - Salga superficial.

2.5 Relatório de Visita Técnica – Cachoeirinha

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO FÁBRICA ESCOLA DE CACHOEIRINHA

Proprietário: Associação de produtores de Cachoeirinha

Data: 01.03.08

- **Unidade Produtora do queijo:** Rua Rita Alves Espínola n° 104
- **Hora de chegada do leite:** Foram 3 chegadas

1°/2° chegada - 7:30	-----	110L
3° chegada - 8:15	-----	30L
Volume total	-----	140L
- **Teste de plataforma realizados:** Foram 3 testes

1° Alizarol	
2° acidez =	18
3° Densidade =	1,26
- **Ações intermediárias:** Não houve desnate
- **Adição de cloreto de cálcio:** Não houve – Motivo estava em falta, mas ocorre frequentemente na proporção de (20mL/100L)
- **Hora de colocação do coalho:** Logo após a mistura dos leites (5 min misturando) – Marca do coalho Ha-la. Proporção do coalho (8mL/ 10L). em 140L foram adicionados aproximadamente 115mL após a adição mexeu por 3 minutos, tampou e esperou o tempo da massa, que é aproximadamente 30min.
- **Tempo de corte da massa:** 20 minutos após a adição do coalho
- **Tempo de mexedura:** Foi realizada duas mexeduras, o intervalo de uma para a outra foi de 10 min. A 1° mexedura é lenta e se dá em 10 min; a 2° mexedura é rápida também 10 min.

Obs.: Na maioria das vezes não é 10min é 7min.

- **Hora da retirada do soro:** Não há choque térmico. A hora de retirada do soro é logo após a sedimentação dos grumos. Toda a massa é envolvida em grande toalha, essa toalha é torcida várias vezes até que todo o soro tenha saído e a massa fique solta.

Obs.: aproximadamente 4L da massa com o soro, são deixas de reserva em jarras, esta serve como argamassa na hora de por os grumos na forma.

- **Pré-prensagem com as mãos:** Ocorre várias vezes para a retirada do soro. A massa adquire forma de barra de queijo na forma de inox.
- **Tipo de prensagem:** Ocorre em forma de inox e a prensagem se faz por auxílio de peso que ficam sobre as formas durante 30min.

- **Prensagem:** Tempo – 30min, mas deixaram por aproximadamente 40min.
Quilo - aproximadamente 1.200kg por barra
Viragem durante a prensagem - ocorre depois de aproximadamente 30min.

Cada lado fica aproximadamente 30 minutos.

Obs.: quando as massas são colocadas na forma de inox, estas são envolvidas por telas.

- **Tipo de Salga:** Dentro da massa, ocorre logo após a retirada do soro. Quantidade de sal utilizado é na proporção de 350g/ 100L – 300g/100L.
- **Tempo de resfriamento:** Barras são resfriadas por aproximadamente 10 a 12 dias.
- **Temperatura de resfriamento:** 6°C +/-2°C
- **Tempo de embalagem:** Logo após saírem da prensa
- **Temperatura de estocagem:** 6°C

Obs₁: Os 4L da massa com o soro, em reserva, são adicionados quando a massa é colocada nas formas de inox, com o objetivo de unir os grumos. É colocada em ambos os lados do queijo. Depois envolve toda a forma com tela e tampa as formas com tampas também de inox.

Obs₂: Prensa com o peso – A 1º prensa iniciou-se de 10:20. De 11hs mudou o lado do queijo e as 11:30 embalou as barras. A barra doada para nosso grupo ficou isolada das outras, e com o peso em cima dela. As demais barras produzidas (11barras) ficaram todas empilhadas com outro peso.

140L de leite rederam 11 barras de queijo, o que foi considerado pouco, pois normalmente 140L de leite rende aproximadamente 14 a 15 barras.

2.6 Relatório de Visita técnica – Arcoverde

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO

Laticínio Rio Branco

Proprietário: José Alberto Estevão Vaz

Data: 01/03/2008

➤ **Procedimento para o fabricação do queijo de coalho:**

- **Chegada do leite:** Pela fábrica estar na própria fazenda do produtor do queijo, o leite é retirado e tão logo levado para o processo de fabricação. A retirada do leite deu-se às 7h25min.

- **Teste de plataforma:** Teste com Alizarol.

- **Adição de cloreto de cálcio:** O produtor adiciona cloreto de cálcio ao leite antes da adição do coalho (7h 35min).

- **Colocação do coalho:** O coalho foi adicionado às 7h36min.

- **Tempo para corte da massa:** O leite coagula por 35 min depois começa a mexedura. A mexedura é realizada por 10 minutos consecutivos e depois espera o soro sair da massa por aproximadamente 5 min.

- **Ações Intermediárias:** Não houve ações intermediárias.

- **Retirada do soro:** O soro foi retirado das 8:25 h até as 8:45 h

- **Pré-prensagem e prensagem:** A pré-prensagem é realizada colocando a massa em caixas plásticas sem o soro por aproximadamente 30 minutos de descanso. Após isso, a massa é cortada com facas e encaixada em formas de plástico para a prensagem em prensa mecânica de inox.

- **Prensagem:** É realizada por 20 minutos.

- **Tipo de salga:** Na própria peça de queijo sem uma medida padrão.

- **Tempo para resfriamento:** O tempo de resfriamento é imediatamente após a prensagem e salga.

- **Temperatura para resfriamento:** Em câmara frigorífica à 7°C.

- **Tempo para embalagem:** O tempo para embalar a peça de queijo é de aproximadamente 7h - 8h de resfriamento.

- **Temperatura de estocagem:** Temperatura de 7°C.

Observações: O ambiente dentro do laticínio é todo refrigerado com o auxílio de ar condicionado. O leite é colocado em uma tubulação de inox com peneira para poder entrar no laticínio, já cai direto no tanque. O laticínio é bem organizado, com limpezas dos botijões que chegam com leite com água e detergente. A embalagem é feita em uma sala à parte. A expedição não tem ligação com a fábrica nem com a área de embalagem. O fluxograma de produção é contínuo, mantendo a distância entre a área limpa e a área considerada suja. O laticínio compra leite de produtores vizinhos, considerando com uma forma de pagamento o tempo de chegada no laticínio, quanto mais cedo o leite chegar mais rentável é para o produtor. Desta forma tenta-se diminuir os efeitos do tempo entre a ordenha e o processamento.

- O proprietário José Alberto é médico veterinário.

**REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS INSTALAÇÕES OBSERVADAS NO
MUNICÍPIO DE ARCOVERDE**



Figura 18. Instalações



Figura 19 -Prensa usada no laticínio



Figura 20. Colocação do cloreto de cálcio no leite



Figura 21. Homogeneização do coalho e cloreto de cálcio no leite



Figura 22. Queijos após saírem do período de resfriamento aguardando para serem embalados.



Figura 23. Queijos embalados esperando para serem lacrados e voltar para a câmara frigorífica.



Figura 24. Queijo embalado indo para a seladora.



Figura 25. Equipamento para selar embalagem plástica a vácuo.



Figura 26. Câmara frigorífica para resfriamento e estocagem do produto até a venda.

ANEXO 2

Relatórios de Visita Técnica da 2ª coleta (23/07/2008 a 25/07/2008)

3.1 Relatório de Visita Técnica – Venturosa

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO
LATICÍNIO: LEITE NOBRE

Proprietário: Romildo Albuquerque Bezerra (23.07.2008)

➤ Procedimento para o fabricação do queijo de coalho:

• **Chegada do leite:** O primeiro lote de leite chegou às 7h15min e foi retirado da fazenda do proprietário do laticínio. Fazenda esta que fica vizinha à fabrica. Um volume de 350 litros foi entregue para processamento.

• **Teste de plataforma:** Apenas o teste de Alizarol.

• **Adição de cloreto de cálcio:** É adicionado cloreto de cálcio na proporção de 100ml de CaCl_2 para cada 450 litros de leite.

• **Colocação do coalho:** O coalho foi adicionado às 7h35min.

• **Tempo para corte da massa:** O corte na massa foi feito às 8h05min, em seguida foi feita a mexedura.

• **Ações Intermediárias:** Houve um pré-corte para que o soro solte da massa às 7h50min.

• **Retirada do soro:** O soro foi retirado com o auxílio de balde e peneira, manualmente às 8h25min.

• **Pré-prensagem e prensagem:** Foi realizada manualmente às 8h50min

• **Prensagem:** O fabricante usava apenas formas de aço inox de um quilograma aproximadamente.

• **Tipo de salga:** A salga é feita colocando-se o sal na superfície do queijo já prensado. Ocorreu às 9h.

• **Tempo para resfriamento:** Às 9h40min o queijo foi levado para a câmara de resfriamento até às 16h30min aproximadamente. Após este período ocorreu o embalamento e posterior volta à câmara de resfriamento até o dia seguinte.

• **Temperatura para resfriamento:** Variando entre 5°C à -2°C . Essa temperatura de -2°C acontece à noite devido a queda de temperatura.

• **Temperatura de estocagem:** Temperatura variando entre 5°C à -2°C.

Observações: Não houve alteração entre a primeira coleta e a segunda. Toda a produção é vendida para Recife; Com 350L de leite foram produzidos 33Kg de Queijo de Coalho.

REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS INSTALAÇÕES OBSERVADAS NO MUNICÍPIO DE VENTUROSA



Figura 27. Laticínio LEITE NOBRE.



Figura 28. Chegada do Leite.



Figura 29. Local onde o leite é despejado e coado.



Figura 30. Leite sendo despejado e coado.



Figura 31. Local onde ocorre a salga do queijo.



Figura 32. Embalagem dos queijos.



Figura 33. Embalagem e selagem dos queijos a vácuo



Figura 34. O queijo devidamente embalado a vácuo



Figura 35. Câmara frigorífica para estocagem do queijo.

3.2 Relatório de Visita Técnica – São Bento do Uma

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO FAZENDA SANTO ANTÔNIO – SÃO BENTO

Proprietário: Ediel de Azevedo Gomes

Data: 24/07/2008

- **Hora de chegada do leite:** a 15-20min, pois o curral fica do lado.
- **Testes antes da ordenha:** CMT
Teste da caneca telada
Obs.: A ordenha foi mecânica e todo leite obtido foi acomodado em baldes de inox pré- lavados com água sanitária
- **Teste de plataforma realizados:** Não fez
- **Ações intermediárias:** Não houve desnate
- **Adição de cloreto de cálcio:** Ocorreu – na proporção de (50g/Kg para aproximadamente 10L de leite)
- **Hora de colocação do coalho:** Logo após 10min– Marca do coalho Ha-la. Proporção do coalho de 2 colheres de sopa de coalho para um copo de água de aproximadamente 300mL. Após a adição mexeu por 3 minutos, tampou e esperou o tempo da massa, que é aproximadamente 30min.
- **Tempo de corte da massa:** 30 minutos após a adição do coalho realizada com colher de mexedura inox
- **Tempo de mexedura:** Realizou uma mexeduras, essa mexedura foi feita lentamente por aproximadamente 7min.
- **Hora da retirada do soro:** Não há choque térmico. A hora de retirada do soro é logo após a sedimentação dos grumos. Toda a massa é envolvida em grande toalha, essa toalha é torcida várias vezes até que todo o soro tenha saído e a massa fique solta.
- **Pré-prensagem com as mãos:** Ocorre várias vezes para a retirada do soro. A massa adquire forma de barra de queijo na forma de inox.
- **Tipo de prensagem:** Ocorre em forma de inox
- **Prensagem:** Tempo - 20min
Quilo - aproximadamente 1.200kg

Obs.: Todo o procedimento para a produção do leite foi realizada em uma pia previamente lavada com água sanitária. As formas de inox foram forradas com telas e dentro dela foi colocada a amassa do queijo. Após colocada a massa dentro da forma, esta mais uma vez é amassada para a retirada do soro retido, logo em seguida a forma é virada e o outro lado da também é amassado com as mãos. Depois de cada lado da forma é colocada uma prancha de inox e mais uma vez é amassado, em seguida uma das pranchas é retirada e um pouco mais da massa é colocada para que a barra fique no tamanho e peso ideal. As telas também foram previamente lavadas com água sanitária.

- **Tipo de Salga:** em superfície

Obs₁: Ediel tem como atividade principal de sua propriedade a venda do leite;

Quanto a especificação do inventário de benfeitorias observa-se a presença do curral e sala de ordenha, muito próximo do local de produção do queijo o que significa que a produção de queijo ocorre logo após a ordenha, sendo hoje realizada mecanicamente/ halde;

O produtor possui um touro e realiza em sua propriedade inseminação artificial e suas vacas são do tipo puro holandês (7/8) 10L de leite rederam 1 barras de queijo.

3.3 Relatório de Visita Técnica – Capoeiras

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO ARRENDAMENTO PIABO – CAPOEIRAS

Proprietário: Flávio Silvestre Pontes

Data: 23/07/2008

1- INVENTÁRIO SOBRE A PROPRIEDADE

Número de Funcionários: 4 funcionários

Escolaridade do proprietário e dos funcionários: Primeiro grau completo

Tamanho da Propriedade: 233 Hectares

Atividade principal da propriedade: Produção de queijo Coalho, palma forrageira, feijão e milho.

Fontes de água:

Poços (período de seca),

Barragem,

Rio (atualmente),

Mineral para consumo.

Chegada do Leite:

O leite começou a chegar as 07:00 hs. Atualmente o produtor recebe leite de 8 rebanhos diferentes. Abaixo segue as quantidades dos produtores para este dia.

1- 31 Litros

5- 22 Litros

2- 98 Litros

6- 189 Litros

3- 22 Litros

7- 11 Litros

4- 20 Litros

8- 25 Litros

O Primeiro queijo, ou seja o queijo coletado, foi elaborado com os 4 primeiros leites chegado e não precisou ser resfriado.

Teste de Plataforma: No presente dia não foi realizado nenhum teste do tipo. Foi relatado que há três meses era aplicado o teste de alizarol para avaliar a acidez provocada por microrganismos.

Adição de Cloreto de Cálcio: Não houve adição de cloreto no presente dia. Foi relatado que estava em falta.

Colocação do Colho: O Coalho foi adicionado as 07:25 hs, dentro do tonel onde havia colocado o leite.

Tempo de Corte da Massa: Em torno de 08:10 hs, a massa foi cortada com a ajuda de uma grande colher, durante 10 minutos.

Retirada do Soro: Foi retirado com ajuda de baldes, a massa juntamente com o soro, e depositada em uma mesa de inox que continha uma tela para filtrar o soro. A massa era espremida até a eliminação do soro.

Pré-Prensagem: Ocorre ainda na retirada do soro por prensagem manual, pois a massa ainda fica na tela onde é posta na forma para moldar o queijo.

Prensagem: é realizada em prensa de mecânica.

Salga: é realizada após a prensagem, o queijo é colocado em prateleiras e o sal é colocado por cima do queijo, por 24 horas.

Embalagem: Depois é feita uma lavagem para retirar o excesso de sal da superfície, sendo posteriormente embalado e resfriamento em freezer até a distribuição do produto.

3.4 Relatório de Visita técnica – Arcoverde

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO

Laticínio Rio Branco

Proprietário: José Alberto Estevão Vaz

Data: 24/07/2008

➤ **Procedimento para o fabricação do queijo de coalho:**

• **Chegada do leite:** Pela fábrica estar na própria fazenda do produtor do queijo, o leite é retirado e tão logo levado para o processo de fabricação. A retirada do leite deu-se às 7h25min.

- **Teste de plataforma:** Teste com Alizarol.
- **Adição de cloreto de cálcio:** O produtor adiciona cloreto de cálcio ao leite antes da adição do coalho (7h 35min).
- **Colocação do coalho:** O coalho foi adicionado às 7h36min.
- **Tempo para corte da massa:** O leite coagula por 35 min depois começa a mexedura. A mexedura é realizada por 10 minutos consecutivos e depois espera o soro sair da massa por aproximadamente 5 min.
- **Ações Intermediárias:** Não houve ações intermediárias.
- **Retirada do soro:** O soro foi retirado das 8:25 hs até as 8:45 hs
- **Pré-prensagem e prensagem:** A pré-prensagem é realizada colocando a massa em caixas plásticas sem o soro por aproximadamente 30 minutos de descanso. Após isso, a massa é cortada com facas e encaixada em formas de plástico para a prensagem em prensa mecânica de inox.
- **Prensagem:** É realizada por 20 minutos.
- **Tipo de salga:** Na própria peça de queijo sem uma medida padrão.
- **Tempo para resfriamento:** O tempo de resfriamento é imediatamente após a prensagem e salga.
- **Temperatura para resfriamento:** Em câmara frigorífica à 7°C.
- **Tempo para embalagem:** O tempo para embalar a peça de queijo é de aproximadamente 7h - 8h de resfriamento.
- **Temperatura de estocagem:** Temperatura de 7°C.

Obs: não foi observada diferença entre a primeira e a segunda coleta.

3.5 Relatório de Visita Técnica – Cachoeirinha

AVALIAÇÃO DA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO DE COALHO FÁBRICA ESCOLA DE CACHOEIRINHA

Proprietário: Associação de produtores de Cachoeirinha

Data: 24.07.08

- **Unidade Produtora do queijo:** Rua Rita Alves Espínola n° 104
- **Hora de chegada do leite:** Foram 3 chegadas
 - 1°/2° chegada - 7:30 ----- 110L
 - 3° chegada - 8:15 ----- 30L

Volume total ----- 140L

- **Teste de plataforma realizados:** Foram 3 testes
 - 1° Alizarol
 - 2° acidez = 18
 - 3° Densidade = 1,26
- **Ações intermediárias:** Não houve desnate
- **Adição de cloreto de cálcio:** Não houve – Motivo estava em falta, mas ocorre freqüentemente na proporção de (20mL/100L)
- **Hora de colocação do coalho:** Logo após a mistura dos leites (5 min misturando) – Marca do coalho Ha-la. Proporção do coalho (8mL/ 10L). em 140L foram adicionados aproximadamente 115mL após a adição mexeu por 3 minutos, tampou e esperou o tempo da massa, que é aproximadamente 30min.
- **Tempo de corte da massa:** 20 minutos após a adição do coalho
- **Tempo de mexedura:** Realizou duas mexeduras, o intervalo de uma para a outra foi de 10 min. A 1° mexedura é lenta e se dá em 10 min; a 2° mexedura é rápida também 10 min.

Obs.: Na maioria das vezes não é 10min é 7min.

- **Hora da retirada do soro:** Não há choque térmico. A hora de retirada do soro é logo após a sedimentação dos grumos. Toda a massa é envolvida em grande toalha, essa toalha é torcida várias vezes até que todo o soro tenha saído e a massa fique solta.

Obs.: aproximadamente 4L da massa com o soro, são deixas de reserva em jarras, esta serve como argamassa na hora de por os grumos na forma.

- **Pré-prensagem com as mãos:** Ocorrem várias vezes para a retirada do soro. A massa adquire forma de barra de queijo na forma de inox.
- **Tipo de prensagem:** Ocorre em forma de inox e a prensagem se faz por auxilio de peso que ficam sobre as formas durante 30min.
- **Prensagem:** Tempo – 30min, mas deixaram por aproximadamente 40min.
Quilo - aproximadamente 1.200kg por barra
Viragem durante a prensagem - ocorre depois de aproximadamente 30min.

Cada lado fica aproximadamente 30 minutos.

Obs.: quando as massas são colocadas na forma de inox, estas são envolvidas por telas.

- **Tipo de Salga:** Dentro da massa, ocorre logos após a retirada do soro. Quantidade de sal utilizado é na proporção de 350g/ 100L – 300g/100L .
- **Tempo de resfriamento:** Barras são resfriadas por aproximadamente 10 a 12 dias.

- **Temperatura de resfriamento:** 6°C +/-2°C
- **Tempo de embalagem:** Logo após saírem da prensa
- **Temperatura de estocagem:** 6°C

Obs₁. Os 4L da massa com o soro, em reserva, são adicionados quando a massa é colocada nas formas de inox, com o objetivo de unir os grumos. É colocado em ambos o lado do queijo. Depois envolve toda a forma com tela e tampa as formas com tampas também de inox.

Obs₂. Prensa com o peso – A 1° prensa iniciou-se de 10:20. De 11hs mudou o lado do queijo e as 11:30 embalou as barras. A barra doada para nosso grupo ficou isolada das outras, e com o peso em cima dela. As demais barras produzidas (11barras) ficaram todas empilhadas com outro peso.

Obs₃. Não foram observadas diferenças entre a primeira e a segunda coleta.