

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal  
Área de Concentração: Biotecnologia

Caracterização e atividade biológica de peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de caseína do leite de cabra Moxotó (***Capra hircus Linnaeus, 1758***)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: profa. Dra. Ana Lúcia de Figueiredo Porto.

Recife, 2011

B574c Bezerra, Vilma Sobral

Caracterização e atividade biológica de peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de caseína do leite de cabra Moxotó (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) / Vilma Sobral Bezerra. – Recife, 2011.

188 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2011.

Inclui referências e anexo.

1 Caseína 2. Cabra Moxotó 3. Hidrólise 4. Antioxidante 5. Antimicrobiano 6. Carreador de zinco I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 636.089

Vilma Sobral Bezerra

Caracterização e atividade biológica de peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de caseína do leite de cabra Moxotó (***Capra hircus Linnaeus, 1758***)

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Aprovado em 15 de dezembro de 2011

#### BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto - UFRPE- Examinadora Titular- orientadora

---

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira -Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns-UAG Examinadora interna- Titular

---

Dra. Raquel Pedrosa Bezerra - CNPq- Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)- Examinadora externa-Titular

---

Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel - Departamento de Ciências Domésticas- Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE- Examinadora externa-Titular

---

Prof. Dr. Edson Holanda Texeira - Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral UFC- Examinador externo-Titular

---

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho -Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE- Examinador externo- Suplente

---

Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Examinadora interna- Suplente

Dedico este trabalho ao meu querido marido e grande incentivador Petronildo e aos meus amados filhos Carol, Cecília e Rafinha.

A minha sempre amada mãezinha, Cecília Sobral (*in memoriam*) pelo apoio incondicional que sempre me fez “crescer”.

## AGRADECIMENTOS

---

À minha orientadora, Dra. Ana Lucia de Figueiredo Porto, a minha gratidão por acreditar em mim, investindo assim sua confiança; por sua contribuição em minha formação e pela oportunidade de “crescimento”. Pela competência e segurança com que conduziu este trabalho; e nas diversas etapas de meu desenvolvimento acadêmico, bem como durante a elaboração dessa tese de doutorado;

À técnica em nanotecnologia do CETENE, Julia Campos pela ajuda na determinação do perfil e sequência peptídica dos hidrolisados no Espectrômetro de massa (MALDI-TOF-MS).

À veterinária, Msc. Tatiana Barros Lira, pelo companheirismo e amizade, durante a primeira etapa deste trabalho, bem como na elaboração do primeiro artigo desse trabalho;

Ao meu colega (colaborador) de doutorado, o biólogo, MSc. Roberto Afonso, pelo companheirismo, amizade, troca de experiências, ensinamentos, ajuda no desenvolvimento dos experimentos e formatação dos artigos;

À farmacêutica, MSc. Carolina Albuquerque pela parceria envolvida na realização do trabalho com a protease extraída de *Penicillium Auratiogriseum*.

Às Dras. Tatiana Porto e Camila Porto pelas contribuições ao desenvolvimento dessa tese;

À Faculdade São Miguel pelo suporte financeiro, muito importante para aquisição de reagentes usados em alguns experimentos deste trabalho;

Ao laboratório de Fertilidade do Solo do DEN da UFPE, na pessoa do prof. Dr. Rômulo Simões e ao Engenheiro Químico Adelson Prado, por ter permitido a utilização do seu laboratório para realização de experimentos necessário elaboração desse trabalho;

Ao prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por ter me acolhido no laboratório de biotecnologia do LIKA-UFPE, para que eu pudesse realizar os experimentos deste trabalho;

As profas. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra (CNPq-UFRPE) e Profa. Dra. Maria Taciana de Holanda Cavalcanti do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, pelas valiosas contribuições na minha qualificação de doutorado.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, os Profs. Drs. Romildo Nogueira, Valdemiro Amaro Junior, Valeria, Ana Maria dos Anjos, Keila Aparecida Moreira e demais professores pelos ensinamentos e contribuições na época das disciplinas do doutorado;

Ao meu chefe da UFPE, no departamento de Geologia, prof. Dr. Alcides Nobrega Sial, pelo empréstimo de materiais de laboratório e por ter entendido as minhas ausências...

À profa. Dra. Valderez Pinto Ferreira do NEG-LABISE, LFR-X, no departamento de Geologia da UFPE por ter permitido a utilização dos equipamentos daquele laboratório para realização da abertura das amostras para análise de zinco;

À Dra. Héliida Karla Philipinni, coordenadora do Laboratório de Análise de Água do ITEP, pela ajuda nas análises de zinco no espectrômetro de absorção atômica (ICP);

À minha colega do LABTECBIO –UFRPE, a Engenheira de Alimentos, Ítala Viviane Mesquita pela troca de experiência, na realização dos experimentos desse trabalho;

Aos técnicos de laboratório do LIKA, Sr. Otaviano e Rafael Padilha, pela inestimável ajuda na utilização dos equipamentos e liofilização das amostras de caseína, hidrolisados e enzimas utilizadas nesse trabalho;

À minha aluna de iniciação científica da Faculdade São Miguel, Roberta Souza pela ajuda na realização dos experimentos de dosagem de proteínas pelo método de Kjeldahl no DEN-UFPE;

À bióloga MSc. Marília Sales, pela amizade e ajuda na interpretação e discussão dos resultados estatísticos;

Aos demais colegas do LIKA-UFPE e LABTECBIO-UFRPE (Mariana Souza, Marcella Oliveira, Germana Michely, Amanda, Ieda, Fabiana, Milena, Marcia Karine, Cinthia, Poliana, Thiago, Tatiana Liu e aos colegas do programa de pós-graduação

em Biociência Animal da UFRPE, os médicos veterinários: Flavio Silva, Maria Helena e Elizabeth, aos biólogos Márcia Nieves, D'Angelo e Marliete, pela companhia e troca de conhecimento durante as exaustivas horas de trabalho no Laboratório de Biotecnologia, bem como durante a fase das disciplinas, diversas reuniões e horas de descontração;

A revisão do inglês nos artigos por Marina Calixto;

Ao produtor de cabras da Fazenda Santa Marta, localizada no município de Sertânia-PE, Sr. Marcelo Mota, por intermédio do médico Veterinário da ADAGRO-PE, Dr. Arcôncio Lins por ter concedido as amostras de leite caprino usados nos experimentos dessa tese;

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FACEPE e a Faculdade São Miguel pelo apoio financeiro; A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigado**

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luiz Fernando Veríssimo



## RESUMO

---

Proteínas lácteas apresentam grande potencial na produção de peptídeos bioativos. A caseína se destaca na produção de bioativos. Entretanto, a sua bioatividade só é conseguida após hidrólise enzimática, ao qual se produz substâncias benéficas à saúde quando incorporados em alimentos ou produtos farmacêuticos. O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar e avaliar atividades biológicas e determinando o perfil peptídico e a sequência de aminoácidos dos peptídeos bioativos obtidos a partir de hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó, usando enzimas proteolíticas tripsina, pepsina, papaína e protease extraída de *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622. A hidrólise enzimática foi realizada através de planejamento experimental estatístico, os quais as variáveis independentes foram pH, relação enzima substrato (E:S), temperatura e tempo de reação na hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó. Os produtos de hidrólise foram visualizados em eletroforese SDS-PAGE. Os hidrolisados submetidos à ultrafiltração (Cut off 3000Da) foram utilizados para determinação das propriedades biológicas. A atividade antioxidante foi avaliada no pool de peptídeos, permeado (<3000Da) e retentado (>3000Da) usando-se o método ABTS<sup>+</sup> [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método do Clinical and Laboratory Standards Institute. O carregamento de zinco através da solubilidade do zinco na amostra através da Espectrometria de Massa em Plasma Indutivamente Acoplado. O perfil peptídico e as sequências de aminoácidos foram determinados por espectrometria de massa MALDI-TOF-MS/MS. O melhor grau de hidrólise (38,27%) foi obtido com a enzima pepsina usando pH 3,0, E:S de 1:100, 40°C e 5 horas de reação. Entretanto, um alto grau de hidrólise impossibilitou o uso desses hidrolisados para obtenção de peptídeos bioativos. Os hidrolisados trípticos da caseína mostraram atividade antioxidante de até 3.242,3µmol.L<sup>-1</sup>TROLOX/mg de peptídeo no retentado (>3000Da). Com o uso da papaína, obteve-se uma atividade de até 2.329,6µmol.L<sup>-1</sup>TROLOX/mg de peptídeo no permeado (<3000Da). Os peptídeos produzidos pela ação da protease produzida por *P. auratiogriseum* apresentaram atividade de 843,17 a 2.587,30µmol.L<sup>-1</sup>de TROLOX/mg de peptídeos para os hidrolisados com 10 e 29% respectivamente, os quais foram compatíveis a antioxidantes naturais, como a vitamina C e α-tocoferol. Os hidrolisados trípticos da caseína caprina apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Escherichia coli* ATCC 2508, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os hidrolisados de caseína mostraram IC<sub>50</sub> de 4,46mg/g para carregamento de zinco. A espectrometria de massa MALDI TOF MS permitiu visualizar os peptídeos no permeado (<3000Da) da caseína caprina, na faixa de 568 a 2.923 Da. Mostraram as sequências LLYQEPVLGPV e HPINHQGLSPEVPNENLLR e da β- e α1-caseína para hidrolisados trípticos da caseína; as sequências LLYQEPVLGPV da β-caseína, NPWDQVK da α2-caseína e NENLL da αS1-caseína nos hidrolisados da caseína com o uso da papaína e a sequência LLYQEPVLGPVRGPFPI da β-caseína no hidrolisado da caseína com o uso da protease produzida por *P. aurantiogriseum* URM 4622. As propriedades bioativas dos hidrolisados da caseína referem-se à prevalência de aminoácidos hidrofóbicos, o que possibilita o uso destes como peptídeos bioativos.

## ABSTRACT

---

Dairy proteins have bioactive peptides production great potential, however, their bioactivity is achieved only after enzymatic hydrolysis, which produces substances beneficial to health when incorporated into food or pharmaceuticals. Among them, casein has been used for this purpose. This study aims to determine peptide profile and amino acid sequence of bioactive peptides derived from Moxotó goat milk casein hydrolysis, using proteolytic enzymes such as trypsin, pepsin, papain and a protease extracted from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622. Enzymatic hydrolysis was performed using a statistical experimental design, which independent variables were pH, enzyme substrate (E: S), temperature and reaction time in Moxotó goat milk casein hydrolysis. Hydrolysis products were visualized in SDS-PAGE electrophoresis. Hydrolysates subjected to ultrafiltration (cut off 3000Da) were used to determine biological properties. Antioxidant activity was evaluated by ABTS<sup>+</sup> [2,2'-Azin-bis (3-ethylbenzothiazoline) 6-sulfonic acid] method, using the pool of peptides (permeate <3000Da; retentate >3000Da). Antimicrobial activity was determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute. Binding through the zinc solubility of zinc in the sample by Mass Spectrometry Inductively Coupled Plasma. Peptide profile and amino acid sequences were determined by mass spectrometry MALDI-TOF-MS/MS. The best hydrolysis degree (38.27%) was obtained with pepsin enzyme pH 3.0, 1:100 E: S, temperature of 40°C and 5 hours time reaction. However, a high hydrolysis degree precluded the use of these hydrolysates for bioactive peptides obtention. Casein tryptic hydrolysates demonstrated antioxidant activity up to 3242.3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ TROLOX/mg peptide in retentate (> 3000Da). By papain use, we obtained an activity up to 2329.6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ TROLOX /mg of peptide in permeate (<3000Da). The peptides produced by *P. auratiogriseum* protease action showed activity from 843.17 to 2587.30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of Trolox / mg of 10 and 29% peptides hydrolysates, respectively, which were compatible with natural antioxidants, such as C vitamin and  $\alpha$ -tocopherol. Goat casein tryptic hydrolysates demonstrated antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Escherichia coli* ATCC 2508, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Casein hydrolysates showed IC<sub>50</sub> of 4.46 mg/g for zinc binding. Mass spectrometry MALDI TOF MS\MS allowed the visualization of caprine casein peptides in permeate (<3000Da), ranging from 568 to 2923 Da. It also showed LLYQEPVLGPV and HPINHQGLSPEVPNENLLR amino acids sequences for  $\alpha$ s1 and  $\beta$ -casein, respectively, from casein tryptic hydrolysates; LLYQEPVLGPV sequences of  $\beta$ -casein, the NPWDQVK  $\alpha$ s2 NENLL-casein and-casein in the  $\alpha$ S1 casein hydrolysates by papain use; LLYQEPVLGPVVRGPFPI  $\beta$ -casein sequence from casein hydrolysates obtained by the use of *P. aurantiogriseum* URM 4622 protease. The casein hydrolysates bioactive properties are referent to the prevalence of hydrophobic amino acids, which possibility of their use as bioactive peptides.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1 – CABRA MOXOTÓ, FONTE: CABRITO... (2011)</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DA <math>\alpha</math>S1 CASEÍNA (VARIANTE B) COM INDICAÇÕES DAS VARIANTES A, C E D FONTE: SGARBIERI (2005)</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3 – SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DA <math>\beta</math>-CASEÍNA (A<sup>2</sup>), ILUSTRANDO AINDA AS MUTAÇÕES PARA A CASEÍNAS A<sup>3</sup>, B E C E OS PONTOS DE CLIVAGEM PARA FORMAÇÃO DAS <math>\gamma</math>-CASEÍNAS. FONTE: SGARBIERI (2005)</b>	<b>26</b>
<b>Figura 4 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DA <math>\kappa</math>-CASEÍNA (B), ILUSTRANDO AINDA AS SUBSTITUIÇÕES PARA A VARIANTE A E O PONTO DE CLIVAGEM (Phe105-Met106) NA ENZIMA COAGULANTE QUIMOSINA FONTE: SGARBIERI (2005)</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5 – ESQUEMA MOSTRANDO A INTERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA À PROTEASE. A PROTEASE ACOMODA UMA ÚNICA CADEIA LATERAL DE RESÍDUO DO SUBSTRATO, SENDO CHAMADA DE SUBSÍTIO FONTE: TURK (2006)</b>	<b>32</b>
<b>Figura 6 – FUNÇÕES DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE CASEÍNA. FONTE: ADAPTADO DE SILVA; MACALTA (2005)</b>	<b>36</b>
<b>Artigo 1</b>	
<b>Figura 1.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato na hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó com papaína, tendo como variável-resposta o grau de hidrólise. 1, pH; 2, temperatura da hidrólise; 3, tempo de duração da hidrólise; e 4, relação enzima:substrato E:S.	<b>57</b>
<b>Figura 2.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato na hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó com tripsina, que tem como variável-resposta o grau de hidrólise. 1, pH; 2, temperatura da hidrólise; 3, tempo de duração da hidrólise; e 4, relação enzima:substrato E:S.	<b>58</b>
<b>Figura 3.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato na hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó com pepsina, que tem como variável-resposta grau de hidrólise. 1, pH; 2, temperatura da hidrólise; 3, tempo de duração da hidrólise; e 4, relação enzima:substrato E:S.	<b>59</b>
<b>Figura 4.</b> SDS-PAGE (coloração por prata) dos hidrolisados com pepsina (1 e 2), tripsina (3 e 4), e papaína (5 e 6). 7, caseína do leite de cabra da raça Moxotó; 8, padrão de massa molar.	<b>60</b>

## Artigo 2

**Figura1:** Perfil peptídico do permeado (<3000Da) de hidrolisado da caseína caprina da raça Moxotó, com grau de hidrólise de 28,5%, através da espectrometria de massa MALDI-TOF-MS/MS. **90**

**Figura 2:** A. Espectro fragmentação MS/MS dos peptídeos de massa molecular 755Da; B. Espectro fragmentação MS/MS dos peptídeos de massa molecular 886Da; C. Espectro fragmentação MS/MS dos peptídeos de massa molecular 1384Da usando o programa Flex Analysis – BRUKER, Daltonics. **91**

## Artigo 3

**Figure 1.** MALDI-TOF spectrum of peptides present in the permeate (<3000Da) of tryptic hydrolysis of casein with caprine DH 28.86% detected by mass spectrometry. **129**

**Figure 2.** Fragmentation of the peptide by MS / MS, parent ion A. 1383.6, B. 2163.9Da, using the program Bruker Daltonics Flex Analysis Inc. **130**

## Artigo 4

**Figure 1:** MALDI TOF Spectrum of *Penicillium aurantiogriseum*. casein peptides hydrolysates protease . **158**

**Figure 2:** MALDI TOFMS/MS pattern of 2106.9 Da peptide. Interpretation of LLYQEPVLGPVRGPFPI amino acid (obtained from  $\beta$ -casein) MS-MS spectrum. **159**

**Figure 3:** Schematic representation of caprine  $\beta$ -casein that produced the peptides listed in Table 4. Arrows show cleavage sites of protease *Penicillium aurantiogriseum*.(GenBank:CAB39200.1 >gi|4495057|emb|CAB39200.1| beta-casein [Capra hircus]) **160**

## LISTA DE TABELAS\QUADROS

---

<b>Quadro 1</b> – TEOR E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS EM VÁRIAS ESPÉCIES DE MAMÍFEROS <b>Fonte:</b> ADAPTADO DE SGARBIERI (2005)	<b>21</b>
<b>Quadro 2</b> – COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS PRINCIPAIS CASEÍNAS EM MOLES/MOLES <b>FONTE:</b> BANKS; DALGLEISH (1990)	<b>28</b>
<b>Quadro 3</b> – SUBCLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES DO TIPO ENDOPEPTIDASES. <b>FONTE:</b> BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008	<b>33</b>
<b>Artigo 1</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 1.</b> Grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó em função das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato (E:S), com utilização da papaína como enzima proteolítica	
<b>Tabela 2.</b> Grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó em função das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato (E:S), com utilização da tripsina como enzima proteolítica.	<b>58</b>
<b>Tabela 3.</b> Grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó em função das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima: substrato (E:S), com utilização da pepsina como enzima proteolítica.	<b>59</b>
<b>Artigo 2</b>	
<b>Tabela 1.</b> Variáveis independentes codificadas de acordo com os níveis estudados para a hidrólise da Caseína caprina com o uso da papaína; Resultados dos ensaios de determinação do grau hidrólise (GH%) e atividade antioxidante expressa em TEAC (equivalentes de TROLOX) da caseína usando a enzima papaína	<b>87</b>
<b>Tabela 2.</b> Efeitos principais e interações do tempo e E:S (significativas estatisticamente) dos parâmetros grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante nos hidrolisados da caseína caprina	<b>88</b>
<b>Tabela 3.</b> Massas moleculares de peptídeos identificados em hidrolisado (29% GH) da caseína caprina com papaína nas frações permeado retentado. Os pesos moleculares em negrito foram identificados na literatura por apresentar propriedades biológicas e funcionais.	<b>89</b>
<b>Artigo 3</b>	
<b>Table 1.</b> Effect of pH, E:S, DH, antioxidant and zinc carrier activity in peptides from Moxotó.	<b>126</b>
<b>Table 2.</b> Statistically significant main effects and interactions estimated from the hydrolysis degree (DH) and antioxidant activity (TEAC) values listed in	<b>127</b>

Table 1. \*Not significant. The main effects were nevertheless retained in the models for hierarchical reasons. <sup>a</sup> hydrolysis of degree; <sup>b</sup>antioxidant activity pool; <sup>c</sup>antioxidant activity permeate; <sup>d</sup>antioxidant activity retentate

**Table 3.** Minimum Inhibitory Concentration of goat casein tryptic hydrolysates test sample for the 6, obtained at pH 8.0 and E: S 1:200 contained in the retentate (> 3000Da) and permeate (<3000Da). **128**

#### **Artigo 4**

**Table 1.** Variable levels used in the 2<sup>3</sup> design to investigate hydrolysis degree and antioxidant activity of casein using *P. aurantiogriseum* URM4622. **161**

**Table 2.** Statistically significant main effects and interactions estimated from the hydrolyses degree ( DH) and antioxidant activity (TEAC) values listed in Table1. **162**

**Table 3.** Effects of independent variables (pH, E:S and time) upon dependent variables (hydrolysis degree and antioxidant activity) in relation to caprine casein hydrolysis by *P. auratiogriseum* URM4622 protease. **163**

**Table 4.** Peptides identified from caprine β-casein, obtained by MALDI TOF MS/MS. X fragmentation by: amino acid not determined. **164**

## SÍMBOLOS DOS AMINOÁCIDOS

---

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina ou Glicocola	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propilônico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propilônico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propilônico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propilônico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2,6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropilônico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropilônico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metil-tio-n-butírico

## SUMÁRIO

---

CAPÍTULO 1.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Objetivos.....	19
CAPÍTULO 2.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 O Leite.....	21
2.2 Leite de Cabra .....	22
2.3 Caseína .....	23
2.3.1 Caseína Caprina.....	28
2.4 Hidrolisados Protéicos.....	29
2.4.1 Fatores que influenciam a Hidrólise Enzimática.....	30
2.4.1.1 Temperatura.....	30
2.4.1.2 pH.....	31
2.4.1.3 Enzima: substrato.....	31
2.4.1.5 Especificidade da enzima.....	31
2.5 Proteases.....	32
2.6 Peptídeos Bioativos.....	35
2.6.1 Atividade Antimicrobiana.....	36
2.6.2 Atividade Antioxidante.....	39
2.6.3 Atividade Carreadora de Minerais (Zinco).....	41
2.7. REFERÊNCIAS.....	43
3 CAPÍTULO.....	54
<b>Artigo 1:</b> Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó.....	55
4 CAPÍTULO.....	64
<b>Artigo 2:</b> Determination of peptide profile and amino acid sequence of caprine casein hydrolysates with antioxidant activity .....	65
5 CAPÍTULO.....	95



<b>Artigo 3:</b> Characterization and biological activities of peptides obtained from tryptic hydrolysis of Moxotó caprine casein by MALDI-TOF-MS\MS.....	96
6 CAPÍTULO.....	133
<b>Artigo 4:</b> Peptides with antioxidant activity obtained by caprine casein hydrolysis using <i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM 4622 protease .....	134
7. CAPÍTULO 7.....	165
Considerações Finais.....	165
ANEXOS.....	167

---

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas constituem substâncias que podem desempenhar funções relevantes na nutrição humana, uma vez que fornecem aminoácidos essenciais nas quantidades adequadas às necessidades de cada organismo para biossíntese de novas proteínas (GONZALEZ; DURR; FONTANELI, 2001).

As proteínas do leite são precursoras de vários peptídeos com atividade biológica. Estes estão inativos dentro da sequência original da proteína, e podem ser liberados pela proteólise enzimática (KRÜGER et al, 2006).

Muitos peptídeos bioativos têm sido identificados como produtos da hidrólise das caseínas de várias espécies, incluindo a caseína caprina a qual pode se constituir uma alternativa à produção de alimentos com propriedades funcionais, as quais podem ser usadas em diversas aplicações biológicas, como por exemplo: inibidores de enzimas, como por exemplo: A enzima conversora de angiotensina (ECA) (SHARPE; GAMBLE; SHARPE, 1994; CLEMENTE, 2000; DONIDA et al, 2009), antimicrobianos (HAYES et al, 2006; HAQUE; CHAND, 2008) antioxidante (FARVIN et al, 2010), carreador de minerais (SRINIVAS; PRAKASH, 2010).

A obtenção de hidrolisados protéicos a partir da caseína caprina pode ser uma alternativa interessante para o estado de Pernambuco, que dispõe de grandes rebanhos cabra Moxotó. Embora essa raça apresente melhor aptidão para o corte, o leite de cabra dessa raça pode ser explorado para produção de peptídeos bioativos, o que deve agregar valor a um produto pouco explorado pela agroindústria local.

O Brasil possui o nono maior rebanho de caprinos do mundo, do qual mais de 90% encontra-se na Região Nordeste (ROCHA et al, 2007). A produção de cabras é muito importante para agropecuária e economia local, uma vez que estes animais apresentam-se como provedores de leite e carne bastante consumidos por populações mais carentes (HAENLEIN, 2004). A cabra moxotó é originária do Vale do Moxotó, Pernambuco. Este animal apresenta características adaptativas que permitem a sua sobrevivência e a reprodução em regiões semi-áridas, principalmente no período de estiagem, o que a torna um recurso genético valioso que, segundo Oliveira (2004), precisa ser conservado e melhor caracterizado.

Silva e Araújo (2000), demonstraram que o aproveitamento do leite caprino da raça Moxotó para nutrição humana e produção de derivados ainda é pouco explorada. Entretanto, devido as características nutricionais benéficas, como a elevada concentração de proteínas de alto valor nutritivo e a possível utilização desse leite por pessoas alérgicas ao leite de vaca (SANTILLO et al., 2009), tornando-se um atrativo a utilização de peptídeos obtidos de proteínas de leite caprino na agroindústria local, apontando a possibilidade da exploração comercial do leite caprino como mais uma fonte econômica na região, possibilitando a produção e obtenção em larga escala de compostos bioativos, com vistas a utilização destes compostos como fármacos e na formulação de alimentos funcionais.

A proposta deste trabalho foi obter e caracterizar peptídeos bioativos por meio de hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra da raça moxotó, avaliando a sua atividade antioxidante, antimicrobiana e carreadora de zinco, bem como determinar o perfil peptídico e seqüência de aminoácidos de peptídeos biologicamente ativos.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Obter, caracterizar e avaliar as atividades biológicas de peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de caseína do leite de cabra Moxotó (*Capra hircus linnaeus*, 1758), provenientes da região do Moxotó-PE.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Extrair e hidrolisar a caseína obtida do leite de cabra Moxotó usando as proteases tripsina, pepsina, papaína e protease produzida por *Penicillium aurantiogriseum* usando planejamentos experimentais estatísticos;
- Separar os peptídeos obtidos por hidrólise através da ultrafiltração, usando uma membrana com porosidade de 3000Da;
- Avaliar o perfil de peptídeos obtidos por hidrólise da caseína por enzimas proteolíticas tripsina, pepsina e papaína através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);

- Determinar a atividade antioxidante, antimicrobiana e carreadora de minerais das frações peptídicas da caseína caprina da raça Moxotó obtidos por hidrólise usando a tripsina, a papaína;
- Determinar atividade antioxidante das frações peptídicas da caseína caprina da raça Moxotó obtidos por hidrólise usando a protease microbiana obtida de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622;
- Determinar e avaliar o perfil peptídico, a massa molecular e sequência primária dos peptídeos obtidos por hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó, usando as enzimas tripsina e papaína e protease microbiana obtida de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622;
- Identificar seqüências de aminoácidos dos peptídeos da caseína de cabra Moxotó com as maiores intensidade massa\carga, usando as enzimas proteolíticas tripsina, papaína e protease microbiana obtida de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 através da fragmentação de íons precursores obtidos pela técnica da espectrometria de massa MS|MS.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. A composição de proteínas no leite varia de acordo com a espécie de mamífero. Ex.: leite de cabra, leite de ovelha (BRASIL, 2002).

O leite é uma mistura heterogênea de inúmeras substâncias, incluindo lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas e enzimas, das quais algumas estão em emulsão, como a gordura e as substâncias associadas, algumas estão em suspensão, como as caseínas ligadas a sais minerais e outras em dissolução verdadeira, como a lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro e sais minerais (ORDÓÑEZ, 2005).

O Quadro 1 apresenta o percentual de proteínas de leite em várias espécies de mamíferos, destacando a razão caseína/proteínas do soro.

ESPÉCIE	PROTEÍNA (%)	CASEÍNA/PROTEÍNA DO SORO (%)
Mulher	1,4	0,2
Cabra	3,9	6,3
Vaca	3,3	4,7
Búfala	5,2	4,6
Veada	10,3	-

**QUADRO 1 – TEOR E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS EM VÁRIAS ESPÉCIES DE MAMÍFEROS**

**Fonte:** ADAPTADO DE SGARBIERI (2005)

Foi demonstrado por Guimarães (1989) que a composição físico-química do leite varia em função de múltiplos fatores, dentre os quais se destacam a raça, o

período de lactação, a estação do ano, a idade do animal, a quantidade de leite produzida e a fisiologia do animal.

## 2.2 Leite de Cabra

No Brasil, as raças de cabras podem ser classificadas em nativas e exóticas (PRATA et al, 1998; SANTOS, 2005). No grupo da raça nativa, destaca-se a raça Moxotó, originária do Vale do Moxotó, Pernambuco. A cabra Moxotó (Figura 1) tem pêlos curtos e lisos e cor baia ou mais clara, com uma lista negra, que se estende do pescoço à base do rabo. Os cabritos, ao nascer, pesam em média, 2 quilos e as fêmeas adultas, chegam a pesar 31 quilos. Essas cabras são consideradas animais bastante rústicos e prolíficos, uma vez que cerca de 40% dos partos são duplos. As fêmeas produzem em média 0,5 litro de leite por dia, com um período de lactação de quatro meses, o que difere das cabras leiteiras que chegam a produzir cerca de 2,5 L/dia (SILVA; ARAÚJO, 2008).



**FIGURA 1 – CABRA MOXOTÓ**  
**FONTE: CABRITO... (2011)**

De acordo com Le Jaquen (1991) e Eloy, Alves e Pinheiro (2001), a produção de leite caprino, situam-se em terceiro lugar no mundo. O Brasil detém o nono maior rebanho caprino mundial, com destaque para a região Nordeste do Brasil que contribui com 90% do rebanho nacional e a região sudeste com apenas 3% desse rebanho. De acordo com a EMBRAPA (2010), Pernambuco possui o quarto maior rebanho de caprinos e ovinos do Nordeste, com cerca de 2,4 milhões de animais, importantes na produção de carne e leite.

O leite caprino apresenta elevado valor biológico e qualidades nutricionais que superam em vários aspectos o leite bovino, pela maior digestibilidade e pelas características dietéticas; por isso, tem sido bastante recomendado para alimentação de crianças, adultos e idosos sensíveis ou alérgicos ao leite de vaca (PARK; JUAREZ; RAMOS, 2007).

A composição centesimal do leite caprino varia de acordo com a localização geográfica e características genéticas do animal. De acordo com trabalho realizado por Araújo et al (2009) a composição físico química do leite de cabra da raça moxotó não difere muito de outras raças brasileiras. Nesses animais, foi detectado um percentual de proteínas totais de 3,69%, esses teores de proteína são semelhantes aos reportados por Costa et al (2008) que obtiveram um percentual de 3,72% para leite de cabras da raça moxotó. Soryal et al (2004) por sua vez, observaram uma variação de 2,26 a 3,35% no teor de proteína no leite de cabras Alpinas.

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) proteínas do soro; b) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; c) enzimas e fatores de crescimento; d) caseínas (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000).

### **6.3 Caseína**

A caseína, uma proteína predominante no leite, constituindo cerca de 80% do seu conteúdo, pode ser classificada como uma fosfoproteína, devido à presença de fósforo. Nutricionalmente, a caseína é uma importante fonte de cálcio, fosfato e aminoácidos necessários para o crescimento e energia de todos os mamíferos, e esta tem sido utilizada comercialmente ao longo do século XX em diversas aplicações nomeadamente na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (LIU; GUO, 2009).





A  $\alpha_{s2}$ caseína possui uma estrutura bipolar com cargas negativas concentradas perto da extremidade N-terminal e positivas próximas a porção C-terminal (WALSTRA; JENNES, 1984; OLIVEIRA; TIMM, 2007). A  $\alpha_{s2}$  caseína é menos sensível á precipitação pelo  $Ca^{++}$  que a  $\alpha_{s1}$  caseína. A  $\alpha_{s2}$  caseína pode ser considerada a maior das quatro classes de caseínas, apresenta 207 resíduos de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica e massa de 25kDa. (GOFF; GRIFFITHS, 2006).

A  $\beta$ -caseína representa 33% do teor protéico da caseína do leite. É uma proteína com 209 resíduos de aminoácidos, apresentando uma massa de 24kDa (GOFF; GRIFFITHS, 2006) sua estrutura é dependente da temperatura. Esta forma grandes polímeros a 20°C, mas não a 4 °C (WALSTRA; JENNESS, 1984). A  $\beta$ -caseína ligada ao núcleo de fosfato de cálcio atua como uma ponte de ligação a outras caseínas (HORNE, 2003). A  $\kappa$ -caseína é uma fosfoproteína dependente do  $Ca^{2+}$ , com massa molar de 19kDa, apresentando 169 resíduos de aminoácidos, dos quais possui cinco unidades de serinas fosforiladas e 35 resíduos de prolina (MIKHEEVA et al, 2003; OLIVEIRA, TIMM, 2007). A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária particularmente a  $\alpha$ -hélice da  $\kappa$ -caseína, promovendo uma estrutura bastante randomizada e com baixo grau de estrutura secundária (OLIVEIRA; TIMM, 2007). Em contrapartida, as estruturas terciárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas (SGARBIERI, 2005). Em razão da composição e da sequência de aminoácidos característicos, as caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam estruturas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária ( $\alpha$ -hélice) e com menos de 10% de estrutura em conformação  $\beta$  (folhas  $\beta$ ) (OLIVEIRA; TIMM, 2007). A Figura 3 apresenta a estrutura primária da  $\beta$ -caseína, mostrando os pontos de clivagem para obtenção das  $\gamma$ -caseínas.





Aminoácidos	$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN
Lisina	14	24	11	9
Histidina	5	3	6	3
Arginina	6	6	4	5
Ácido Aspártico <sup>a</sup>	15	18	9	11
Trionina	5	15	9	14
Serina <sup>b</sup>	16	17	16	13
Ácido Glutâmico <sup>c</sup>	39	40	39	27
Prolina	17	10	34	20
Glicina	9	2	5	2
Alanina	9	8	5	15
Valina	11	14	19	11
Metionina	5	4	6	2
Isoleucina	11	11	10	13
Leucina	17	13	22	8
Tirosina	10	12	4	9
Fenilalanina	8	6	9	4
Triptofano	2	2	1	1
Cisteína	0	2	0	2
Fosforina	8	11	5	1

<sup>a</sup> Inclui asparagina; <sup>b</sup> Inclui fosfoserina; <sup>c</sup> Inclui glutamina

**Quadro 2 – COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS PRINCIPAIS CASEÍNAS EM MOLES/MOLES**  
**FONTE: BANKS; DALGLEISH (1990)**

### 2.3.1 Caseína Caprina

As caseínas do leite de cabra se assemelham às caseínas do leite de vaca, uma vez que apresentam proporções semelhantes de  $\kappa$ -caseína, que variam entre 20 e 24% do conteúdo da caseína e  $\alpha_{S2}$ -caseína, que contribuem com 5 a 19% da composição da caseína. Porém, o leite de cabra contém níveis mais elevados de  $\beta$ -caseína, na ordem de 42 a 64% e no leite de vaca essa fração representa em média 38% dessa sub-fração protéica, além de baixos teores de  $\alpha_{S1}$ -caseína, que variam entre 4 e 26% para o leite caprino em contraste com os valores de 36 a 40% para a  $\alpha_{S1}$ -caseína do leite bovino (CLARK; SHERBON, 2000). Quanto à fração protéica considerada a causadora de alergia ao leite de vaca, a  $\alpha_{S1}$ -caseína, esta existe no leite de cabra em quantidade bastante reduzida e estrutura diferente nas duas espécies e isto faz com que este se torne um produto hipoalergênico, representando um aspecto que deve ser levado em consideração na escolha pelo leite de cabra para pessoas com alergias ao leite de vaca (HAENLEN, 2004).

## 2.4 Hidrolisados Protéicos

Desde os anos 1940, os hidrolisados protéicos têm sido usados na terapia em pacientes com deficiência nas enzimas proteolíticas e com disfunção nutricional. A partir da década de 70, o uso de hidrolisados protéicos cresceu devido a seus aspectos nutricionais e clínicos, bem como pela demanda por alimentos com melhores propriedades funcionais (FREITAS et al, 1993; BOZA; MARTÍNEZ-AUGUSTIN; GIL, 1995; CÂNDIDO, 1998; CLEMENTE, 2000; CARREIRA et al, 2003).

A obtenção de hidrolisados protéicos pode ser conseguida através da hidrólise química (ácida ou alcalina) ou enzimática. A hidrólise ácida e alcalina apresenta a desvantagem de serem inespecíficas, e ainda podem destruir aminoácidos importantes para a atividade biológica da proteína, como o triptofano, a lisina, a treonina, além de causar uma racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1985). A hidrólise enzimática melhora as propriedades funcionais e bioativas das proteínas, de modo que os produtos obtidos mostram aplicabilidade em vários produtos alimentícios, como por exemplo, a obtenção de hidrolisados da caseína (SILVESTRE; HAMON; YVON, 1994; SILVA et al, 2003; CAPOBIANGO et al, 2006; CAVALLI et al, 2008).

A caracterização de hidrolisado para utilização em alimento é fator importante para o conhecimento da qualidade e distribuição dos peptídeos liberados no processo hidrolítico. Observa-se que o tamanho da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção desses peptídeos no trato digestivo (GRIMBLE et al, 1986). Produtos alimentícios contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, podem ser melhores absorvidos pelo organismo do que uma mistura de aminoácidos livres ou mesmo a proteína intacta, apresentando assim, maior valor nutritivo e funcional (BOZA; MARTÍNEZ-AUGUSTIN; GIL, 1995, BOZA et al, 2000).

### **2.4.1 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática é um processo complexo devido às muitas ligações peptídicas que são degradadas e a acessibilidade específica para as reações enzimáticas. Existem muitos fatores que interferem nas reações enzimáticas, dentre os quais se destacam a temperatura, o pH, o tempo de reação, a natureza da enzima, especificidade da enzima e a relação enzima:substrato. De certo modo, esses fatores afetam amplamente a cinética das reações enzimáticas e o efeito destes fatores podem ser diferentes para cada enzima proteolítica estudada. Dessa forma, é importante aprofundar o estudo dos parâmetros tendo em vista que os peptídeos bioativos são obtidos por este meio e a sua biodisponibilidade é determinada por esse controle (VIANA et al, 2004).

#### **2.4.1.1 Temperatura**

O efeito da temperatura na reação enzimática é muito importante. Sabe-se que cada enzima apresenta uma temperatura ótima de atuação, sendo dependente da duração da reação. Assim, ocorre uma grande variação entre as enzimas no que se refere às características de resistência ao calor, uma vez que sua estabilidade térmica está inversamente relacionada com a duração de uma reação hidrolítica (REED, 1975).

É crucial a determinação da melhor temperatura de reação, pois a variação da temperatura é um fator importante na hidrólise protéica. A uma temperatura de 4-5°C as interações hidrofóbicas na caseína são fracas e parte dessas se dissocia das micelas, na  $\beta$ -caseína. Quando a hidratação aumenta, as cadeias de  $\beta$ -caseína projetam-se da superfície micelar e uma pequena parte do fosfato de cálcio se dissolve. Estas trocas são responsáveis pela ligeira desintegração das micelas (WALSTRA, 1990). Porém em altas temperaturas a quantidade de fosfato de cálcio associado às micelas aumenta e ocorre dissociação da  $\kappa$ -caseína, diminuindo a estabilidade (O'CONNELL et al, 2006; OLIVEIRA; TIM, 2007).

Enzimas são termolábeis, assim o calor de desnaturação leva a uma perda da atividade biocatalítica, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura. Deste modo, a ação da temperatura sobre a atividade enzimática tem sido utilizada como método para a interrupção da reação hidrolítica, empregando-se

temperaturas na faixa de 80°C a 90°C, por 10 a 20 minutos (SILVA; MACALTA, 2005).

#### **2.4.1.2 pH**

A caseína se mantém estável a um pH neutro ( $\approx 7,0$ ), mas é precipitada no seu ponto isoelétrico (pH = 4,6). O pH é, portanto um dos fatores cinéticos mais importantes para a ação da enzima. As ligações que mantêm as micelas de caseína juntas são mais fracas e escassas em pH 5,2, mas a acidificação dessa proteína diminui a carga de hidratação, levando deste modo a um pH inferior, o aumento da atração eletrostática entre as moléculas de caseína, levando a aproximação das micelas e coagulando essa proteína (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; O'CONNELL et al, 2006).

#### **2.4.1.3 Relação Enzima: substrato**

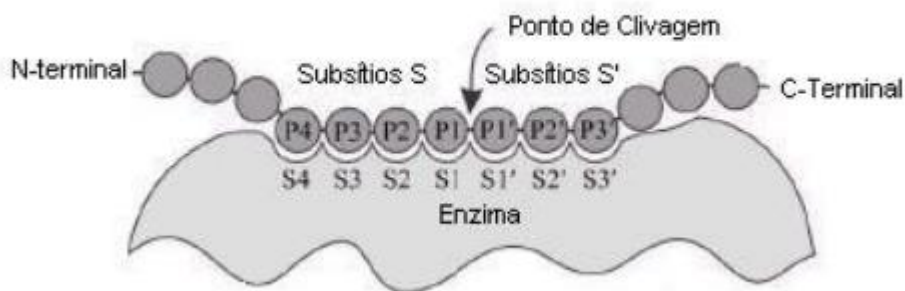
A relação enzima substrato (E: S) é um fator relevante na velocidade da reação enzimática bem como na produção de peptídeos no final do processo de hidrólise (GUO; PAN; TANOKURA, 2009).

Comparando dois hidrolisados da caseína usando enzimas pancreáticas, Silvestre, Hamon e Yvon (1994) mostraram que uma redução na relação E: S de 1: 25 para 1: 200 levou à um maior conteúdo de grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos), e a uma menor proporção de peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos) e aminoácidos livres no entanto o teor de di- e tripeptídeos permaneceu inalterado. Assim, a diminuição da relação enzima : substrato pode favorecer a produção de peptídeos em escala industrial. O aumento da concentração do substrato está associado à redução da quantidade de água e, conseqüentemente, do tempo gasto no processo de secagem. A redução da relação E: S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise (BIASUTTI, 2006, p. 64).

#### **2.4.1.4 Especificidade da enzima**

O sítio ativo da enzima possibilita a interação desta com um substrato com o propósito de acelerar a reação. A reação enzimática depende da especificidade da

enzima, portanto é possível determinar as características do sítio ativo de uma enzima através de um estudo da cinética de reação (POLGÁR, 2005). Para determinar a especificidade das proteases deve-se considerar a organização estrutural do sítio catalítico (BARRET; RAWLINGS; WOESSNER, 1998). A configuração de aminoácidos e a estrutura do sítio ativo da enzima mostram como os resíduos de aminoácidos da enzima podem interagir com o substrato, levando a uma maior ou menor interação da enzima ao substrato (especificidade da enzima). Na Figura 5 está exemplificada a interação de uma protease com seu substrato protéico, observa-se que os subsítios são numerados S1-Sn em direção ao N-terminal do substrato, e S1` - Sn` em direção ao C-terminal, enquanto os resíduos do substrato acomodados são numerados de P1 - Pn, e P1` - Pn`, respectivamente (TURK, 2006).



**Figura 5 – ESQUEMA MOSTRANDO A INTERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA À PROTEASE. A PROTEASE ACOMODA UMA ÚNICA CADEIA LATERAL DE RESÍDUO DO SUBSTRATO, SENDO CHAMADA DE SUBSÍTIO**  
**FONTE: TURK (2006)**

## 2.5 Proteases

As enzimas proteolíticas catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. Estas enzimas constituem uma grande família, as endopeptidases e exopeptidases, estas são classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (RAO, 1998; BAI; GE; ZANG, 1999; CLEMENTE, 2000). A ação dessa enzima poderá refletir na composição final dos produtos de hidrólise, bem como no tamanho médio dos peptídeos (GAUTHIER; POULIOT, 2003). As exopeptidases atuam nos finais das cadeias polipeptídicas, com ação no N ou C terminal, sendo assim denominadas aminopeptidases e



carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal (TURK, 2006).

As proteases são classificadas em quatro subgrupos de acordo com seu mecanismo catalítico: serina protease, aspártico protease, cisteína protease e metaloprotease (Berg, et al 2008). Um resumo dessas subclasses de protease pode ser visualizado no Quadro 3.

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>AMINOÁCIDO NO SÍTIO ATIVO</b>	<b>EXEMPLO</b>
Aspártico protease	Aspartato	Pepsina
Serina protease	Serina	Subtilisina Serina alcalina
Cisteína protease	Cisteína	Tripsina Papaína
Metaloprotease	Metal zinco	Alcalino Neutro

**QUADRO 3 – SUBCLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES DO TIPO ENDOPEPTIDASES**

**FONTE:** BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008

A fonte para obtenção da protease é relevante para a obtenção de hidrolisados com características biológicas apreciáveis. As proteases podem ser extraídas de plantas, animais e micro-organismos (RAO, 1998). Sgarbieri (1996) mostrou que a obtenção de oligo e polipeptídeos com propriedades bioativas pode ser conseguida por hidrólise seletiva de algumas ligações peptídicas de proteínas alimentares.

A tripsina (E.C. 3.4.21.4) é uma protease de origem animal produzida pelo pâncreas em uma forma inativa denominada tripsinogênio, que ao atingir o duodeno se transforma em tripsina ativa devido à enteroquinase presente no suco intestinal. Esta pode ser classificada como uma endopeptidase, a qual catalisa a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonila (-CO) estejam presentes a arginina ou lisina. A tripsina pode ser obtida de pâncreas de bovino ou suíno, apresenta pH de ação entre 7,0- 9,0 e temperatura máxima de atividade proteolítica de 40°C (SGARBIERI, 1996; PINTADO; PINTADO; MALCATA, 1999; CARREIRA et al, 2003; KRUGER et al, 2006; ZHU et al, 2007).

A papaína (EC 3.4.22.2), uma endopeptidase, que pode ser classificada como cisteíno protease. Pode ser obtida de folhas de mamão (*Papaya carica*), as quais são usadas há muitos anos por nativos da América Central para amaciar

carnes, nestas folhas contém a enzima papaína (ROBINSON, 1987). Sua estrutura é formada por uma cadeia peptídica com 212 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 23.350 Da (GHOSH, 2005). A papaína atua na hidrólise de substratos contendo resíduos de lisina, arginina ou valina. É estável a altas temperaturas, apresentando pH ótimo de atividade entre 6,0 e 7,5 (GHOSH, 2005), porém o aparecimento de características sensoriais desagradáveis torna desvantajosa a sua utilização em escala industrial, o qual pode ser minimizada com o uso conjunto de proteases.

A pepsina (E.C.3.4.3.2) é uma protease digestiva, sintetizada no estômago e secretada pelo suco gástrico com objetivo de hidrolisar as proteínas. Sua atuação ocorre no meio ácido, em pH próximo a 2, no qual a maioria das enzimas são desnaturadas. A temperatura de máxima atividade proteolítica situada a 40°C (SGARBIERI, 1996; ALTUN; CETINUS, 2007). A pepsina é menos específica que a quimosina, no entanto é capaz de hidrolisar ligações peptídicas com fenilalanina, tirosina, leucina ou resíduos de valina (AGUDELO et al, 2004; PAPOFF et al, 2004; ROMAN; SGARBIERI, 2005).

Carreira et al (2004) e Sakanaka et al (2005) demonstraram que a utilização conjunta de proteases como pepsina, trpsina, subtilisina e a tripsina em conjunto com a quimotripsina, respectivamente podem ser empregadas para obtenção de hidrolisados de caseína possibilitando a produção de hidrolisados de alto valor funcional e ainda diminuir os custos de produção.

Proteases produzidas por microorganismos podem ser usadas com finalidades biotecnológicas. A protease produzida por *Penicillium aurantiogriseum* (URM4622) constitui-se uma protease com características serino colagenolíticas, o qual apresenta pH 9,0 e temperatura de 36°C como os melhores parâmetros para obtenção da melhor atividade enzimática. Os extratos enzimáticos utilizados nesse trabalho foram obtidos da “micoteca” do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e gentilmente cedidos por Carolina Albuquerque Lima (LIMA et al, 2011).

A utilização de enzimas proteolíticas para hidrólise da caseína ovina e caprina, com vistas a aplicações dos peptídeos na produção de peptídeos bioativos, foi relatada por Trujillo, Guamis e Carretero (1997), Trujillo (2000), Cavalli et al, (2008), Santillo et al, (2009), porém não foram encontrados relatos de estudos de caseínas do leite de cabra Moxotó.

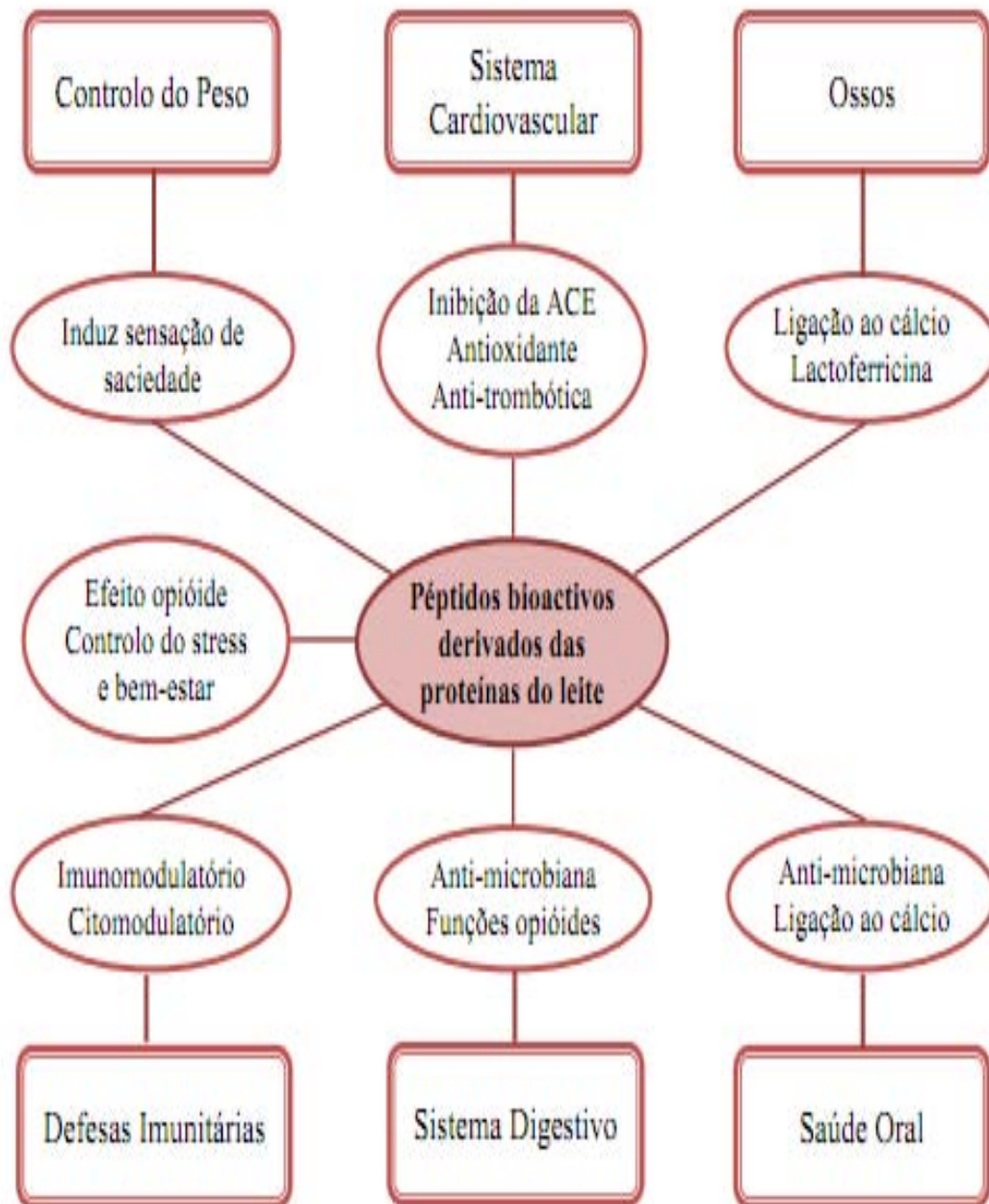
## 2.6 Peptídeos Bioativos

O termo peptídeo bioativo foi mencionado na literatura em 1950 por Mallander, quando foi sugerido que derivados fosforilados da caseína estariam relacionados aos processos de calcificação óssea independente da vitamina D (MEISEL, 1998).

Peptídeos bioativos de proteínas dos alimentos representam uma fonte de componentes que melhoram a saúde, podem ser incorporados em alimentos funcionais ou utilizados como nutracêuticos (MEISEL; FITZ-GERALD, 2003). Embora vários animais e vegetais conttenham proteínas como potenciais péptidos bioativos, as proteínas do leite são as principais fontes de peptídeos biologicamente ativos. Como mencionado anteriormente, muitos bioativos do leite estão latentes e inativos na seqüência primária da proteína, necessitando da ação de enzimas proteolíticas para liberação. Peptídeos bioativos podem ser produzidos *in vivo*, após ingestão de proteínas do leite, devido a ação de enzimas do trato gastrintestinal, ou ainda podem ser produzidos *in vitro* por ação das enzimas proteolíticas (ROMAN; SGARBIERI, 2005). Na Figura 6 estão apresentadas esquematicamente algumas das funções dos peptídeos bioativos e os seus órgãos alvo.

Desde 1979, diversos autores (MEISEL; SCHLIMME, 1996; LEPPÄLÄ-PIHLANTO, 2001; GOMEZ-RUIZ et al, 2002; SALAMI et al, 2008; CONTRERAS et al, 2011; CARREIRA et al, 2001) têm descrito peptídeos bioativos originários de proteínas do leite são capazes de exercer efeito opióide, antitrombótico, anti-hipertensivo, antimicrobiano, imunomoduladores e apresentam propriedades de carreadores de íons.

A pesquisa em peptídeos bioativos tem se desenvolvido bastante ao longo dos últimos trinta anos (LAHOV et al, 1972; LEPPÄLÄ-PIHLANTO, 2001; MINERVINI et al., 2003; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2007), pois se tem constatado diversas possibilidades de tratamento médico a partir de suas atividades biológicas.



**Figura 6 – FUNÇÕES DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE CASEÍNA**  
**FONTE: ADAPTADO DE SILVA; MACALTA (2005)**

### **2.6.1 Atividade Antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana está relacionada a substâncias que matam e/ou inibem o desenvolvimento de micro-organismos, sendo denominados microbicidas e microbiostáticos, respectivamente.

Os peptídeos antimicrobianos geralmente contêm entre 12 e 50 resíduos de aminoácidos, são moléculas catiônicas, devido ao excesso de resíduos de lisina, arginina e histidina ( $\text{pH} \leq 7$ ), anfipáticos e são relativamente pequenos (HANCOCK; SCOTT, 2000).

McCann et al (2006), mostraram que já foram isolados e caracterizados cerca de 500 peptídeos com atividade antimicrobiana de uma grande variedade de organismos, como as proteínas do ovo (IBRAHIM; AOKI; PELLEGRINI, 2002), de espinafre (SEGURA et al, 1998), da geleia real (FONTANA, 2004) e de peixes marinhos (PARK et al, 1997), mas a maioria dos peptídeos antimicrobianos alimentares são derivados das proteínas do leite (FLORIS et al, 2003).

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 *Streptococcus* sp. Em seguida, comprovou-se que proteínas alimentares podem agir como precursores de peptídeos antimicrobianos ao iniciar a defesa natural do organismo contra patógenos invasores. A atividade antimicrobiana do leite e do colostro foi atribuída principalmente a imunoglobulinas e proteínas não imunes como lactoferrinas, nomeado lactoferricina, lactoperoxidase e lisozimas (PAKKANEN; AALTO, 1997). Existem relatos da década de 1970 que mostravam caseínas como fontes de peptídeos antimicrobianos. Estas constituíam um grupo de polipeptídeos de alto peso molecular, chamados casecínas, identificados em caseína tratada com quimosina em pH neutro (LAHOV et al, 1972). Esses peptídeos apresentaram propriedades bactericidas contra várias bactérias patogênicas, como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e do gênero *Lactobacillus*.

Foram demonstrados vários fragmentos antibacterianos derivados da  $\alpha_{s1}$ -caseína (LAHOV; REGELSON, 1996),  $\alpha_{s2}$ -caseína (ZUCH et al, 1996, McCANN et al, 2005),  $\kappa$ -caseína (MALKOSKI et al, 2001). A Isracidina é um peptídeo antibacteriano derivado da  $\alpha_{s1}$ -caseína tratado com quimosina (LAHOV; REGELSON, 1996) que inibe o crescimento *in vitro* do *Lactobacillus*. *In vivo* a isracidina exerce um efeito de proteção contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* quando administrado em doses baixas, como por exemplo, 10 $\mu\text{g}$ /100 g rato (HAQUE; CHAND, 2008). A casocidina-I

foi o primeiro peptídeo catiônico, com 39 aminoácidos, o qual apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus carnosus* (BRADSHAW, 2003; ZUCHT et al, 1995). Fragmentos antibacterianos derivados da  $\alpha_{s2}$ -caseína foram identificados através da digestão do caseinato de sódio pela quimosina (McCANN et al, 2005). Os peptídeos identificados possuíam próximo a uma região C-terminal positivamente carregada, e consistiam nos fragmentos f(181–207), f(175–207) e f(164–207) da  $\alpha_{s2}$ -caseína. Esses peptídeos foram ativos contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com uma CIM de 21–168 mg/mL para o f(181–207), 10.7–171.2 mg/mL para f(175–207) e 4.8–76.2 mg/mL para f(164–207) (LÓPEZ-EXPÓSITO; RECIO, 2006).

A procura por peptídeos antimicrobianos têm se ampliado para caseínas de outras espécies de animais. Peptídeos antibacterianos foram identificados do hidrolisado com pepsina da  $\alpha_{s2}$ -caseína ovina (LÓPEZ-EXPÓSITO et al, 2006), corresponderam as seqüências f(165–170), f(165–181), f(184–208) e f(203–208) da  $\alpha_{s2}$ -caseína ovina, e foram similares aos fragmentos f(165–181) e f(184–208) da  $\alpha_{s2}$ -caseína bovina. Caseína de leite de coelho hidrolisada com tripsina produziu peptídeos com atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (BARANYI; THOMAS; PELLEGRINI, 2003), tendo como principal fragmento a  $\beta$ -caseína, esses peptídeos apresentam caráter aniônico, não apresentando efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram-negativas, pois ocorre o impedimento da interação com componentes da membrana celular. Peptídeos antimicrobianos também foram obtidos em leite humano hidrolisado com o uso da proteinase obtida de *Lactobacillus helveticus* PR4 (MINERVINI et al, 2003).

Liepke et al (2001) identificaram um peptídeo antimicrobiano da  $\kappa$ -caseína humana, o qual foi obtido após acidificação do leite humano e incubação com pepsina. Este peptídeo foi denominado Kappacina, o qual consiste em um derivado da  $\kappa$ -caseína fosforilada e não glicosilada de um caseinomacropéptido. Este peptídeo apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas (*Streptococcus mutans*) e Gram negativas (*Porphyromonas gingivalis*). A liberação de kappacina no estômago constitui um meio para limitar a infecção do trato gastrointestinal em recém nascidos, o qual os peptídeos bioativos possibilitaram um colapso no gradiente de cátions na transmembrana da bactéria que levará a morte do micro-organismo (HAQUE; CHAND, 2008). Por outro lado, um pentapeptídeo da

$\kappa$ -caseína bovina com atividade antimicrobiana foi descrito por Matin, Monnai e Otani (2000). Este peptídeo denominado  $\kappa$ -caseicidina, foi isolado do leite pela digestão triptica da  $\kappa$ -caseína, o qual inibiu o crescimento de bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus typhimurium* (HAQUE; CHAND, 2008).

Diferentemente dos mecanismos de ação de antibióticos clássicos, que se baseiam em inibições enzimáticas (LOHNER; PRENNER, 1999), os peptídeos antimicrobianos interagem na superfície de células bacterianas causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica, ocasionando uma lise celular. Além disso, o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos, provavelmente ocorre devido a combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos. Estes peptídeos carregados positivamente são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, onde sofrem mudanças conformacionais adotando uma estrutura anfipática (ZASLOSFF, 2002; BECHINGER, 2004; SANDERSON, 2005, BECHINGER; LOHNER, 2006).

### **2.6.2 Atividade Antioxidante**

Antioxidantes é um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos químicos que tem a capacidade de bloquear o efeito danoso dos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

Segundo Rufino et al, (2007) os radicais livres do oxigênio, apresentam elétrons desemparelhados, ajudando a danificar moléculas encontradas no organismo. Quando esses radicais reagem com as moléculas do organismo ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Nessas condições esses radicais ativos podem entregar seu elétron não-pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. Os radicais tornam-se estáveis, mas a molécula atacada transforma-se em radical. Este processo aqui apresentado leva a uma reação em cadeia, destruindo o tecido atingido (YOUNGSON, 1995; VIÑA et al, 2000; SUBUDHI et al, 2001).

A inibição de biomoléculas por peroxidação e eliminação de radicais livres produzidos *in vivo* tem sido relatado para alguns peptídeos, aminoácidos e seus

derivados, tais como cisteína, histidina, triptofano, lisina, arginina, valina, leucina e  $\beta$ -hidroxi triptofano, que podem assim apresentar atividade antioxidante (UCHIDA; KAWAKISHI, 1992; MURAMOTO; CHEN; YAMAUCHI, 1996).

Várias proteínas alimentares apresentam peptídeos com atividade antioxidante (KRISTINSSON; RASCO, 2000; CARLSEN et al, 2003; RAJAPAKSE et al, 2005; JE; PARK; KIM, 2005; JE et al, 2007; BERNARDINI et al, 2011). Adicionalmente, esses peptídeos podem ser encontrados em hidrolisados protéicos de algumas proteínas de origem animal, como peixe (YOU et al, 2009), ovo (DÁVALOS et al, 2004) e proteínas obtidas de vegetais, como batata (PIHLANTO; AKKANEN; KORHONEN, 2008) e soja (LEE; CHO; KIM, 2008). As caseínas do leite são muito estudadas por apresentarem atividade antioxidante (SUETSUNA; UKEDA; OCHI, 2000; KANSCI et al, 2004; LÓPEZ-EXPÓSITO et al, 2007; GÓMEZ-RUIZ et al, 2008).

Vários métodos tem sido usado para determinar a atividade antioxidante em amostras biológicas, dentre os quais se destacam os métodos baseados na captura do radical peroxila, no poder de redução do metal, na captura do radical hidroxila, na captura do radical orgânico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (DPPH) e na medida de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (ARUOMA, 2003). Dentre estes métodos o DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl radical), ORAC ("Oxygen-Radical Absorbancy Capacity) e ABTS (ou TEAC "Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) são alguns dos mais usados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

O método DPPH está baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo decréscimo da absorbância a 515 nm, este método foi modificado por Sánchez-Moreno, Laurrauri e Saura-Calixto (1998) para medir os parâmetros cinéticos em reações de oxidação (GÜLÇİN et al, 2006).

O método ORAC usa a proteína Phycoerythrin (PE) (Ficoeritrina), fotossintética, marcadora de fluorescência, como alvo dos radicais. O ORAC mede a diminuição da emissão de fluorescência de PE em presença de um composto azo, gerador de radicais. A habilidade antioxidante é comparada a um padrão que, na maioria das vezes, é o trolox. A PE pode ser oxidada por AAPH para gerar radical peroxila (Teste ORAC RO<sub>2</sub>•) ou por Cu<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para gerar radical hidroxila (Teste ORAC HO•). O teste ORAC combina o tempo de inibição e a percentagem (%) de inibição da ação do radical pelo antioxidante para quantificação da inibição. O teste



expressa os resultados como unidades de ORAC ou equivalentes do trolox (CAO; PRIOR, 1998).

O método da captura do radical ABTS, é um método muito utilizado em investigações de atividade antioxidante em alimentos de origem vegetal. Esse radical pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (KUSKOSKI et al, 2005).

A capacidade antioxidante relativa a TROLOX, refere-se a habilidade de o peptídeo antioxidante decompor o radical peroxila (radical azo 2,2'-azobis(2-amidinopropane). Assim, o ensaio TEAC mede a habilidade de antioxidantes em doar elétrons e estabilizar o radical 2,2'-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) (ROMAY; PASCUAL; LISSI, 1996).

Estudos têm sido realizados no intuito de investigar propriedades antioxidantes de hidrolisados da caseína. Zulueta et al, (2009), investigaram a capacidade antioxidante de proteínas do leite bovino em varias amostras de leite comercial, usando os métodos da diminuição da fluorescencia do radical livre (ORAC) e pelo método ABTS. Morten, Clausen e Skibsted (2009) investigaram a atividade antioxidante de pequenos peptídeos obtidos da caseína,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina bovina, usando os métodos ORAC e ABTS. Por outro lado, Farvin et al (2010) procederam uma caracterização das frações peptídicas em amostras de iogurte, os quais liberam aminoácidos livres com atividade antioxidante durante o processo de fermentação do leite.

### **2.6.3 Atividade Carreadora de Minerais (Zinco)**

O zinco desempenha funções cruciais em diversos processos biológicos do organismo, incluindo a síntese protéica, o metabolismo de DNA e RNA, metabolismo de carboidratos e lipídios, metabolismo energético, entre outras (MILLER, 1983).

O zinco é absorvido por todo o intestino delgado, principalmente no jejuno e íleo, por difusão passiva simples ou através de transporte mediado por carreadores localizados na borda "em escova" dos enterócitos, considerando que sua absorção aumenta rapidamente quando o teor de zinco dietético é baixo. Da mesma forma, quando há um aumento na ingestão dietética de zinco, a porcentagem que é absorvida diminui. Logo, a quantidade de zinco absorvida é variável, dependendo da demanda do organismo.

De acordo com Gibson (2001) existem fatores que favorecem a absorção do zinco, com destaque para a glicose, a lactose, a proteína de soja e o vinho tinto. Tem sido descrito que proteínas de origem animal podem facilitar a absorção de zinco, através da liberação na digestão de aminoácidos e peptídeos que contém cisteína, formando complexos solúveis com o zinco, presentes em proteínas de origem animal (GIBSON, 2001; GRAVAGHI et al, 2007 ).

O mecanismo pelo qual derivados da caseína exercem o efeito de vincular a minerais, refere-se à presença de grupos fosfatos provenientes de resíduos de serina fosforilados em estreita proximidade com a cadeia do peptídeo, os quais criam domínios polares ácidos favoráveis em seqüestrar metais bivalentes, como cálcio, zinco, cobre, manganês e ferro (FERRARETTO et al, 2001; FERRARETTO et al, 2003; GRAVAGHI et al, 2007; DONIDA et al, 2009).

Os caseinofosfopeptídeos (CPP) e os glicomacropéptídeos (GMP) são os mais importantes peptídeos da caseína com a propriedade de carrear metais. A presença de aminoácidos fosforilados como SerP-SerP-SerP-Glu-Glu incorporados a cadeia peptídica pode se constituir uma característica distintiva dos caseinofosfopeptídeos. Esses carreadores de metais podem ser obtidos como derivados da  $\beta$ -caseína,  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína e  $\alpha_{s2}$ -caseína (KITTS, 2005; WANG et al, 2007).

## REFERÊNCIAS

- ADDEO, F. et al. Characterization of the 12% trichoroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmegiano-Reggiano Cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 59, n. 3, p. 401-411, 1992.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. **Alimentos**, v. 6, p. 29-33, 1985.
- AGUDELO, R. A. et al. Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 325–333, 2004.
- ALTUN, G. D.; CETINUS, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 100, p. 964-971, 2007.
- ARAÚJO, M. J. et al. Produção e composição do leite de cabras Moxotó submetidas a dietas com feno de maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell Arg.) **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 4, p. 860-873, 2009.
- ARUOMA, O. I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 9, n. 20, p.523-524, 2003.
- BAI, H.; GE, SHI-JUN; ZANG, LONG-XIANG. Total hydrolysis of food proteins by the combined use of soluble and immobilized protease. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 95-99, 1999.
- BANSAI, P. S. et al. Chemical synthesis and structure elucidation of bovine  $\kappa$ -casein (1-44). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 1098-1103, 2006.
- BANKS, W.; DALGLEISH, D. G. Milk processing . In: Robinson, R. K. (eds). 2. ed. **Dairy Microbiology** - The microbiology Milk. New York, USA, 1990.
- BARANYI, M.; THOMAS, U.; PELLEGRINI, A. Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 189–197, 2003.
- BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Academic Press, 1998. 1666 p.
- BECHINGER, B. Structure and function of membrane-lytic peptides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 271-292, 2004.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic. **Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p.1529-1539, 2006.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BERNARDINI, R. D. et al. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1296–1307, 2011.

BIASUTTI, E. A. Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina. **Dissertação de Mestrado em Farmácia**. Faculdade de Farmácia da UFMG, 88p. 2006.

BOZA, J. J. et al. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, v. 39, p. 237-243, 2000.

BOZA, J. J.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; GIL, A. Nutritional and antigenic characterization of end enzymatic whey protein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v, 43, n. 4, p. 872-875, 1995.

BRADSHAW, J. P. Cationic antimicrobial peptides: Issues for potential clinical use. **Biodrugs**, v. 17, p. 233–240, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, v. 183, p. 13-22, 2002.

CABRITO real: carnes nobres de caprinos. Disponível em: <<http://www.cabritoreal.com.br/imagens/moxoto.jpg>. Acesso em: 20 nov. 2011.

CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*):** composição, propriedades nutritivas e funcionais. 207 f. 1998. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

CAO, G.; PRIOR, R. L.; Serum Antioxidant Capacity Is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Women. **Clinical Chemistry** (Washington, DC, U. S.) 1998, 44, 1309.

CAPOBIANGO, M. et al. Action of Pepsin on Emulsifying Properties of Globin. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 2, p. 357-364, 2006.

CARLSEN, C. U. et al. Pro- and antioxidative activity of protein fractions from pork (longissimus dorsi). **European Food Research and Technology**, v. 217, p.195–200, 2003.

CARREIRA, R. L. et al. Analysis of Peptide Profiles of Casein Hydrolysates Prepared with Pepsin, Trypsin and Subtilisin. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2001.

CAVALLI, S. V. et al. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v. 106, p. 997–1003, 2008.

CLARK, S.; SHERBON, J. W. Genetic variants of alpha s1 casein in goat milk: breed distribution and associations with milk composition and coagulation properties. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 135-143, 2000.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hidrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

CONTRERAS, M. M. et al. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 566-573, 2009.

COSTA, R. G. et al., Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 694-702, 2008.

CREAMER, L. K. et al. Micelle stability:  $\kappa$ -casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3004-3012, 1998.

DALGLEISH, D. G. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. **Journal of dairy science**, Elsevier, New York, NY, v. 81, n. 11, p. 2973-3028, 1998.

DÁVALOS, A. et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1939-1944, 2004.

ELOY, A. M. X.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. (Ed.). **Orientações técnicas para a produção de caprinos e ovinos em regiões tropicais**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2001. 79 p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agência de informação-Agronegócio do leite. 2010. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_2172003\\_9243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_2172003_9243.html)>. Acesso em: 23 dez. 2010.

FARVIN, K. H. S. et al. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1090-1097, 2010.

FERRARETTO, A. et al. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1655-1661, 2001.

FERRARETTO, A. et al. Casein-derived bioactive phosphopeptides: role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. **FEBS LettSep**, v. 11, n. 551, p. 92-98, 2003.

FLORIS, R. et al. Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1257–1275, 2003.

FONTANA, R. Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**, v. 25, p. 911–928, 2004.

FOX, P. F. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advances in Food & Nutrition Research**, v. 39, p. 163-328, 1996.

FREITAS, O. et al. Characterization of proteins hidrolysates prepared for enteral nutricion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1432-1438, 1993.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 78-87, 2003.

GHOSH, S. Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 264, p. 6-16, 2005.

GIBSON R. S. Are changes in food consumption patterns associated with lower biochemical zinc status among women from Dunedin, New Zealand? **British Journal of Nutrition**, v. n. 86, p. 71-80, 2001.

GOFF, H. D.; GRIFFITHS, M. W. Major Advances in Fresh Milk and Milk Products: Fluid Milk Products and Frozen Desserts. **Journal Dairy Science and Technology**, v. 89, n. 4, p. 1163-1173, 2006.

GOMEZ-RUIZ, J. et al. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1061-1067, 2008.

GONZALEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Nutrição e o Metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 72 p.

GRAVAGHI, C. et al. Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells: relationship between biological activity and supramolecular structure. **FEBS Journal**, v. 274, p. 4999–5011, 2007.

GRIMBLE, G. K. et al. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. **Clinical Science**, v. 71, n. 1, p. 65-9, 1986.

GUIMARÃES, M. P. Caracterização de alguns componentes celulares e físico-químicos do leite para o diagnóstico da mastite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 2, p. 129-142, 1989.

GÜLÇİN, İ. et al. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. **Phytomedicine**, v. 13, p. 343–351, 2006.

GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from

whey protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 114, p. 328–333, 2009.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 1, p. 155-63, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. United Kingdom: Oxford Science Publications, 2000.

HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8856-8861, 2000.

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

HAYES, M. et al. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2260–2264, 2006.

HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, p. 255-263, 2003.

IBRAHIM, H. R.; AOKI, T.; PELLEGRINI, A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: Lysozyme and aprotinin as model molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 671–693, 2002.

JE, JAE-YOUNG et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 840-846, 2007.

JE, JAE-YOUNG; PARK, PYO-JAM; KIM, SE-KWON. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, p. 45-50, 2005.

KANSCI, G. et al. B-Caseinophosphopeptide (f1-25) confers on b-casein tryptic hydrolysate an antioxidant activity during iron/ascorbate-induced oxidation of liposomes. **Lait**, v. 84, p. 449-462, 2004.

KITTS, D. D. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 549–554, 2005.

KRISTINSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 657–666, 2000.

KRÜGER, C. C. H. et al. Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina, **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 7-12, 2006.

KRÜGER, C. C. H. **Produção e caracterização química e fisiológica de caseinofosfopeptídeos de leite bovino**. 149 f. 2006. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of alpha-casein. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, p. 183-190, 2002.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAHOV, E. et al. Properties of basic glycopeptides from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft* 26:489–495. **Milchwissenschaft**, v. 26, p. 489–495, 1972.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and Immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. **Federal Chemistry Toxicology**, v. 34, p. 131–145, 1996.

LE JAQUEN, J. L. La leche de cabra. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: vaca: cabra: oveja**. Zaragoza, ES: Acríbia, 1991. p. 343-380. 1 v.

LEE, C. H.; CHO, W. T.; KIM, W. Fermented soybean relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 735-741, 2008.

LEPPÄLÄ-PIHLANTO, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and aceinhibitory peptides. **Trends in food science e technology**, v. 11, p. 347-356, 2001.

LIEPKE, C. et al. Purification of novel peptide antibiotic from human milk. **Journal of Chromatography B**, v. 752, p. 369-77, 2001.

LIMA, C. A. et al. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A variableial study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 549-560, 2011.

LIU, Y.; GUO, R. The interaction between casein micelles and gold nanoparticles. **Journal Interface Science**, v. 332, p. 265-269, 2009.

LOHNER, K.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 141-156, 1999.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I. et al. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. **Le Lait**, v. 87, p. 241-249, 2007.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I. et al. Identification of antibacterial peptides from ovine  $\alpha$ 2-casein. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1072–1080, 2006.



LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; RECIO, I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1294–1305, 2006.

LOURENÇO, E. J. Proteínas do leite bovino. In: \_\_\_\_\_. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, SP: Edição Funep, 2000. p. 179-231. cap. 5.

MALKOSKI, M. S. G. et al. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2309–2315, 2001.

MATIN, M. A.; MONNAI, M.; OTANI, H. Cytotoxic and antibacterial activities of chemically synthesized  $\kappa$ -casecidin and its partial peptide fragmente. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 197–207, 2000.

McCANN, K. B. et al. Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164–207) region of bovine as2-casein. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 133–143, 2005.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 363-373, 1998.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 27–31, 2003. Suplemento.

MEISEL, H.; GOEPFERT, A.; GUNTHER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 307–311, 1997.

MIKHEEVA, L. M. et al. Thermodynamics of micellization of bovine  $\beta$ -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v. 19, p. 2913-2921, 2003.

MILLER, W. J. Zinc in animal and human health. In: ROSE, J. (Ed.). **Trace elements in health: a review of current issues**. London: Butterworths, 1983. p. 182-189.

MINERVINI, F. et al. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolysec casein of milk from six species. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5297- 5305, 2003.

MORTEN, R.; CLAUSEN, L. H.; SKIBSTED, J. S. Characterization of Major Radical Scavenger Species in Bovine Milk through Size Exclusion Chromatography and Functional Assays. **Journal Agricultural Food Cheistry**. 57, 2912–2919. 2009.

MURAMOTO, K.; CHEN, H.; YAMAUCHI, M. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Report of the Soy Protein Research Committee**, v. 17, p. 23–28, 1996.

O'CONNELL, J. E. et al. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 312-317, 2006.

OLIVEIRA, J. C. V. **Caracterização e perfil etnológico de rebanhos caprinos nos Municípios de Ibimirim e Serra Talhada, Estado de Pernambuco**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561-562, p.17-22, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. P. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Artmed, 2005. 454 p. 2. PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 285–297, 1997.

PAPOFF, C. M. et al. Proteolytic activity of animal rennet on ovine casein. **Michwissenschaft**, v. 59, p. 414–417, 2004.

PARK, C. B. et al. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus Anguillicaudatus*. **FEBS Letters**, v. 411, p. 173–178, 1997.

PARK, Y. W.; JUAREZ, M.; RAMOS, M. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p.88-113, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PIHLANTO, A.; AKKANEN, S.; KORHONEN, S. J. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). **Food Chemistry**, v. 109, p. 104-112, 2008.

PIHLANTO-LEPPALA, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and aceinibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 347-356, 2001.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2161-2172, 2005.

PRATA, L. F. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). Região Sudeste, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n.4, 1998.

RAJAPAKSE, N. et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussul sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, p. 175-182, 2005.

RAO, M. B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

- REED, G. (Ed.) **Enzymes in food processing**. 2 ed. London: Academic Press, 1975, 573 p.
- ROBINSON, D. S. **Food: biochemistry and nutritional value**. England: Longman Scientific and Technical, 1987. 576 p.
- ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005.
- ROMAY, C.; PASCUAL, C.; LISSI, E. A. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29, 175–183. 1996.
- ROCHA, L. L. et al. Avaliação Morfoestutural de Caprinos da Raça Moxotó. **Archivos de Zootecnia**, v. 56 (Sup. 1), p. 483-488. 2007.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico).
- SALAMI, M. Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 4, p. 471-478, 2011.
- SAKANAKA, S. et al. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 464–468, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LAURRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A. Procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton. v. 76, n. 10, p. 270-276, 1998.
- SANDERSON, J. M. Peptide–lipid interactions: insights and perspectives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 201-212, 2005.
- SANTILLO, A. et al. Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 655–660, 2009.
- SANTOS, C. L. **Criação de Caprinos de Corte**. Viçosa, MG: CPT, 2005. 168 p.
- SEGURA, A. et al. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). **FEBS Letters**, v. 435, p. 159–162, 1998.
- SGARBIERI, V. C. **Caseínas em alimentos protéicos**: propriedades: degradações: modificações. São Paulo: Varela, 1996. 516p.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHARPE, S. J.; GAMBLE, G. D.; SHARPE, D. N. Cholesterol-lowering and blood pressure effect of immune milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 929-934, 1994.

SILVA, F. L. R.; ARAÚJO, M. R. A. Características produtivas de cabras 1/2 anglo nubianas, + ¼ pardo Alpina +1/4 moxotó. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2008, Visçosa, MG. **Anais...** Visçosa, MG: RASBZ, 2008.

SILVA, J. G. et al. Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw batter quality and on the stability of ham pâté. **Meat Science**, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2003.

SILVA, S.; MACALTA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides, **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1-15, 2005.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994.

SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 129–141, 2000.

SORYAL, K. A. et al. Effect of feeding systems on concentrate of goat milk e yield of Domiati cheese. **Small Ruminant Research**, v.54, n.1-2, p.121-129, 2004.

SRINIVAS, S.; PRAKASH, V. Bioactive peptides from bovine milk  $\alpha$ -casein: Isolation, characterization and multifunctional properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics** v. 16, p. 7-15. 2010

SUBUDHI, A. W. et al. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 11, p. 32-41, 2001.

SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activity peptides derived from casein. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 128–131, 2000.

TRUJILLO, A. J. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, v. 71, p. 449–457, 2000.

TRUJILLO, A. J.; GUAMIS, B.; CARRETERO, C. Proteolysis of goat casein by calf rennet. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 579-588, 1997.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature*, v. 5, p. 785-799, 2006.

UCHIDA, K.; KAWAKISHI, S. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)/ascorbate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 13-16, 1992.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza, ES: Acribia, 1995. 474p.

VIANA, F. R. et al. Effect of different parameters on the quality of meat emulsions. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 5-10, 2004.

VIÑA, J. et al. Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life**, v. 50, p. 271-7, 2000.

WALSTRA P., JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza, ES: Acribia, 1984. 423 p.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International dairy journal**, v. 9, p. 189-192. 1999.

WALSTRA, P. On the Stability of Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. 782 p.

WANG, J. et al. Analysis of effect of casein phosphopeptides on zinc binding using mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1546–1554, 2007.

YOU, L. et al. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative food science & emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 235-240, 2009.

YOUNGSON, R. **Como Combater os Radicais Livres: o programa de saúde dos antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campos, 1995. 168 p.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides in health and disease. **The New England journal of medicine**, v. 347, n. 15, p. 1199-2006, 2002.

ZHU, X. et al. Simultaneous Determination of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Tryptic Casein Hydrolysate by High-Performance Liquid Chromatography Combined with a Replicate Heart-Cut Column-Switching Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8367–8371 8, 2007.

ZUCHT, H. D. et al. Casocidin-I: A casein- $\alpha$ 2 derived peptide exhibits antibacterial activity. **FEBS Letters**, v. 372, p. 185–188, 1996.

ZULUETA, A. et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 380–385, 2009.

**Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do  
leite de cabra Moxotó**

Artigo publicado na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)

Fator de impacto 0,4125

## Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó

Tatiana Barros Ferreira Lira<sup>(1)</sup>, Vilma Sobral Bezerra<sup>(1)</sup>, Flávio de Oliveira Silva<sup>(1)</sup>,  
Giselle Maria Pereira Dias<sup>(2)</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>(2)</sup>, Tatiana Souza Porto<sup>(1)</sup>  
e Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE. E-mail: tatyvet@gmail.com, villsb@yahoo.com.br, foliveirasilva@gmail.com, portots@yahoo.com.br, analuporto@yahoo.com.br

<sup>(2)</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rêgo, s/nº, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE. E-mail: diasgmp@yahoo.com.br, joseluz60@gmail.com

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da temperatura, pH, relação enzima:substrato (E:S) e tempo de reação sobre a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó, com uso de diferentes enzimas proteolíticas. A hidrólise enzimática da caseína caprina foi realizada com uso de tripsina, pepsina e papaína. Para cada enzima, foram utilizados dois níveis de cada variável, na avaliação de seus efeitos sobre a hidrólise da caseína, em um fatorial completo 2<sup>4</sup>. Os produtos da hidrólise foram visualizados em eletroforese SDS-PAGE. O melhor valor do grau de hidrólise com a enzima papaína foi obtido em pH 6,5, E:S de 1:150 e 5 horas de hidrólise a 50°C (28,17%); com a tripsina, em pH 8,5, E:S de 1:150 e 5 horas a 40°C (29,55%); e com a pepsina, em pH 3,0, E:S de 1:100 e 5 horas a 40°C (38,27%). A hidrólise da caseína caprina é influenciada positivamente pelo pH e tempo de hidrólise, com o uso da pepsina. Foram observadas interações significativas antagônicas entre pH e relação E:S, com o uso da tripsina; e entre pH, temperatura e tempo de hidrólise, com o uso da papaína. A pepsina apresenta elevada eficiência na hidrólise de  $\alpha_1$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, evidenciada por hidrolisados com massa molar abaixo de 14,4 kDa.

**Termos para indexação:** *Capra hircus*, leite de cabra, papaína, pepsina, proteólise, tripsina.

### Evaluation of the variables that influence the enzymatic hydrolysis of Moxotó goat's milk casein

**Abstract** – The aim of this work was to evaluate the effects of temperature, pH, enzyme:substrate ratio (E:S), and reaction time on the enzymatic hydrolysis of Moxotó breed goat's milk casein, using different proteolytic enzymes. Enzymatic hydrolysis of the capric casein was performed using trypsin, pepsin and papain. For each enzyme, two levels of the variables were used to assess their effects on the hydrolysis of casein, using a full factorial design (2<sup>4</sup>). The hydrolysis products were visualized on SDS-PAGE. The best hydrolysis degree using papain were at pH 6.5, E:S of 1:150 and 5 hours of hydrolysis at 50°C (28.17%); for trypsin, at pH 8.5, E:S of 1:150 and 5 hours at 40°C (29.55%); and for pepsin, at pH 3.0, E:S of 1:100 and 5 hours at 40°C (38.27%). Capric casein hydrolysis is affected positively by pH and reaction time, using pepsin. Significant antagonistic interactions were observed between pH and E:S, with trypsin; and between pH, temperature and reaction time, with papain. Pepsin has high  $\alpha_1$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -casein hydrolysis efficiency, evidenced by the molar masses below 14.4 kDa of its products.

**Index terms:** *Capra hircus*, goat's milk, papain, pepsin, proteolysis, trypsin.

### Introdução

O Brasil possui o nono maior rebanho de caprinos do mundo, do qual mais de 90% encontra-se na Região Nordeste (Rocha et al., 2007). A raça Moxotó é nativa do nordeste brasileiro e apresenta características adaptativas que permitem a sobrevivência e a reprodução em regiões semi-áridas, principalmente no período de estiagem, o que a torna um recurso genético valioso que, segundo Oliveira (2004), precisa ser conservado e melhor caracterizado.

O estudo das propriedades funcionais e nutricionais dos produtos lácteos é estratégia adequada para melhor aproveitamento do leite caprino (Santillo et al., 2009). As características peculiares do leite de cabra, do ponto de vista nutricional e social, motivam pesquisas para avaliação de aspectos produtivos e qualitativos de sua produção (Fernandes et al., 2008).

A maior digestibilidade do leite de cabra se deve à maior quantidade de ácidos graxos de cadeia curta e ao menor diâmetro dos glóbulos de gordura. Há crescente



interesse pela utilização desse produto como alimento funcional, em consonância com a atual tendência de alimentação saudável (Olalla et al., 2009). Entre as características nutricionais benéficas do leite de cabra, destacam-se a elevada concentração de proteínas de alto valor nutritivo e a possível utilização desse leite por pessoas alérgicas ao leite de vaca (Olalla et al., 2009; Santillo et al., 2009).

As proteínas do leite estão entre os temas que despertam grande interesse científico, em razão de sua importância na nutrição e fisiologia humana. Os efeitos das proteínas do leite sobre a saúde humana podem estar relacionados à proteína intacta, aos aminoácidos da proteína totalmente digerida e aos peptídeos da proteína parcialmente hidrolisada (Michaelidou, 2008). Entre as proteínas que constituem o leite, 80% são representadas pelas caseínas e 20% pelas proteínas do soro (Olalla et al., 2009).

Leónil et al. (2000) destacam o crescente interesse tecnológico por hidrolisados enzimáticos proteicos de produtos lácteos, uma vez que a hidrólise enzimática pode contribuir para a melhoria das propriedades funcionais das proteínas, e esses produtos são fontes ricas em proteínas, cálcio, vitaminas e compostos bioativos, o que aumenta seu potencial de emprego na elaboração de alimentos e ingredientes funcionais.

A caseína apresenta elevada susceptibilidade à ação catalítica das proteases conhecidas (Carreira et al., 2003). A maioria dos peptídeos derivados da caseína que apresentam atividade biológica é produzida *in vitro* pelo uso de proteinases, especialmente a tripsina (Krüger, 2006; Rossini et al., 2009). A utilização de enzimas proteolíticas para hidrólise da caseína caprina, com vistas a aplicações futuras dos peptídeos, foi relatada por Trujillo et al. (1997), Cavalli et al. (2008) e Santillo et al. (2009), porém não foram encontrados relatos de estudos sobre a raça Moxotó.

O controle dos parâmetros da hidrólise enzimática das proteínas é importante para a obtenção de produtos com elevada qualidade nutricional (Biasutti, 2006). Estudos realizados por Guo et al. (2009) mostraram a importância de avaliar a temperatura, o pH, o tempo e a relação enzima-substrato durante o processo de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite bovino.

O grau de hidrólise é um critério quantitativo da reação de proteólise utilizado para comparar hidrolisados entre si, e é definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao total de ligações peptídicas (Biasutti, 2006). A hidrólise enzimática pode ser avaliada por vários

métodos, entre os quais destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida uni ou bidimensional, a cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa, a eletroforese capilar e a espectrometria de massa (Krüger, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura, pH, relação enzima:substrato (E:S) e do tempo de reação sobre o grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó, com a utilização de diferentes enzimas proteolíticas.

### Material e Métodos

O leite caprino da raça Moxotó foi obtido de forma higiênica, conforme procedimentos estabelecidos na Instrução Normativa Nº. 37 de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2000). O animal utilizado para extração do leite era proveniente do Município de Sertânia, Estado de Pernambuco, Brasil.

As amostras de leite foram congeladas imediatamente após a coleta e mantidas em nitrogênio líquido. O procedimento da extração da caseína foi realizado segundo Egito et al. (2006), exceto pela retirada do tolueno. O precipitado da caseína foi solubilizado com 1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, até pH 7,0, e submetido à diálise contra água deionizada a 4°C por 96 horas. Após a liofilização da caseína, foram preparadas soluções que continham 2% de caseína em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para hidrólise com papaína e tripsina, e em solução tampão HCl-KCl, para hidrólise com a pepsina.

O efeito das variáveis pH, temperatura, tempo e relação enzima:substrato (E:S) sobre o grau de hidrólise (GH) foi avaliado de acordo com o planejamento fatorial completo (2<sup>4</sup>), em que as variáveis foram avaliadas em dois níveis, conforme as recomendações de Bruns et al. (2006). Foram realizados 16 ensaios correspondentes às combinações entre os níveis das variáveis, com quatro repetições no ponto central. O mesmo planejamento foi realizado com utilização das enzimas tripsina (EC. 3.4.21.1), papaína (EC. 3.4.22.2) e pepsina (EC. 3.4.23.1), com diferença apenas quanto ao pH, que é específico para cada enzima. Os parâmetros utilizados na hidrólise foram: temperatura de 40, 45 e 50°C; tempo de hidrólise de 1, 3 e 5 horas; e relação E:S de 1:150, 1:125 e 1:100.

O pH utilizado na hidrólise da caseína foi diferente para cada enzima: papaína, 6,5, e 7,0 e 7,5; tripsina, 7,5, 8,0 e 8,5; e pepsina, 2,0, 2,5 e 3,0. As enzimas foram adquiridas da Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.



A seleção das variáveis e de seus níveis foi feita de acordo com a literatura (Carreira et al., 2003; Soares et al., 2004; Guo et al., 2009; Rossini et al., 2009). A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Statistica 8.0 (StatSoft, 2008). Após a hidrólise, as amostras foram submetidas à agitação por 30 segundos e colocadas em banho-maria com água a 90°C, por 15 minutos, para inativação das enzimas.

Para a determinação do grau de hidrólise das enzimas proteolíticas, utilizou-se a metodologia adaptada de Pezoa & Salas-Mellado (1979). As amostras foram centrifugadas a 12.000 g, durante 10 minutos. O GH foi expresso segundo a relação das quantidades de proteínas solúveis determinadas pelo método de Lowry et al. (1951) e de proteínas totais presentes no substrato (caseína), determinadas pelo método de Kjeldahl, preconizado por Horwitz (2000).

Os hidrolisados da caseína foram analisados por eletroforese SDS-PAGE conforme Laemmli (1970), em gel a 15% de concentração, e corados por Coomassie brilliant blue R-250 (Varghese & Diwan, 1983) e corante de prata (Switzer et al., 1979). A utilização dessa metodologia se aplica à visualização dos hidrolisados proteicos com diferentes massas molares. Nas corridas eletroforéticas, foram aplicados 3 µL das amostras na concentração de 1 µg µL<sup>-1</sup>, com exceção da amostra de caseína presente na linha 7, na qual foi aplicada 5 µL. Os marcadores de baixa massa molar (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) usados foram fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa).

### Resultados e Discussão

O maior GH obtido com o uso da papaína foi 28,17%, nas condições de hidrólise pH 6,5, E:S 1:150, tempo de hidrólise de 5 horas e temperatura de 50°C (Tabela 1).

O gráfico de Pareto representa os efeitos estimados das variáveis e de suas interações sobre o grau de hidrólise, em ordem decrescente de magnitude (Figura 1). O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado. A linha vertical é usada para julgar quais efeitos são estatisticamente significativos (Bruns et al., 2006).

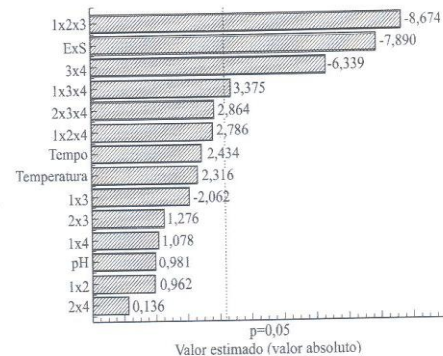
A única variável principal que apresentou efeito significativo com o uso de papaína foi a relação E:S, com efeito negativo, ou seja, as menores relações E:S (1:150)

favoreceram o GH. Esse resultado indica que deve haver um equilíbrio entre a concentração da enzima e do substrato para que a hidrólise seja eficiente, mas não excessiva.

**Tabela 1.** Grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó em função das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato (E:S), com utilização da papaína como enzima proteolítica.

Hidrolisado <sup>(1)</sup>	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	E:S	Grau de hidrólise (%)
1	6,5	40	1	1:150	14,85
2	7,5	40	1	1:150	14,62
3	6,5	50	1	1:150	13,47
4	7,5	50	1	1:150	21,51
5	6,5	40	5	1:150	20,94
6	7,5	40	5	1:150	23,69
7	6,5	50	5	1:150	28,17
8	7,5	50	5	1:150	17,32
9	6,5	40	1	1:100	20,30
10	7,5	40	1	1:100	10,89
11	6,5	50	1	1:100	9,11
12	7,5	50	1	1:100	19,62
13	6,5	40	5	1:100	6,24
14	7,5	40	5	1:100	13,19
15	6,5	50	5	1:100	15,54
16	7,5	50	5	1:100	13,53
17 (C)	7,0	45	3	1:125	24,67
18 (C)	7,0	45	3	1:125	26,73
19 (C)	7,0	45	3	1:125	23,17
20 (C)	7,0	45	3	1:125	24,67

<sup>(1)</sup>Hidrolisados resultantes de dois níveis das variáveis avaliadas e do ponto central (C).



**Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato na hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó com papaína, tendo como variável-resposta o grau de hidrólise. 1, pH; 2, temperatura da hidrólise; 3, tempo de duração da hidrólise; e 4, relação enzima:substrato E:S.

Resultado semelhante foi encontrado por Morais et al. (2002), que relataram a influência da relação E:S sobre a hidrólise da caseína bovina com uso de papaína, e observaram que a alteração da relação E:S de 2 para 4% alterou significativamente o conteúdo de todas as frações cromatográficas, e produziu um perfil peptídico diferente, com diminuição dos níveis de di- e tripeptídeos e aumento do teor de aminoácidos livres e de peptídeos médios. O aumento da relação E:S deveria promover a quebra dos grandes e médios peptídeos a di- e tripeptídeos, porém levou à clivagem desses aminoácidos livres. O pH, a temperatura e o tempo de reação apresentaram interação significativa para o GH da caseína caprina pela papaína.

O trabalho realizado por Cavalli et al. (2008) mostrou que a digestão do caseinato de sódio do leite de cabra, hidrolisado com peptidases aspárticas de extrato de flores *Silybum marianum*, a pH 6,5, foi observada após 1 hora. Porém, a digestão torna-se mais intensa com o decorrer do tempo de reação, sendo a  $\beta$ -caseína caprina degradada em 40%, enquanto a  $\alpha_1$ -caseína em 68%, após 24 horas de incubação. Os resultados do presente trabalho corroboram os encontrados por esses autores, com o maior GH obtido com uso do mesmo pH (6,5) em maior tempo de hidrólise. Carreira et al. (2003) recomendam que a duração da reação hidrolítica não seja superior a 5 horas, porque este tempo pode favorecer a contaminação microbiana das preparações proteicas. Além disso, na obtenção dos hidrolisados enzimáticos, deve-se levar em consideração a relação custo-benefício da aplicação em escala industrial.

Com o uso de tripsina, observou-se que o maior valor de GH (29,55%) foi obtido a pH 8,5, com a relação E:S 1:150, durante 5 horas, à temperatura de 40°C (Tabela 2). Esses resultados corroboram os obtidos por Qi et al. (2003) que, ao utilizar a tripsina para hidrólise da caseína, mostraram que o GH aumentou de 5 para 15% quando o tempo de hidrólise aumentou de 9 minutos para 1 hora e 30 minutos, na temperatura de 40°C. Porém, Morato et al. (2000) mostraram que não houve vantagem na ação da tripsina sobre a hidrólise da caseína, quando o tempo de hidrólise foi aumentado de 2 horas e 30 minutos para 4 horas e 55 minutos, pois a produção de pequenos peptídeos não foi aumentada nesse caso.

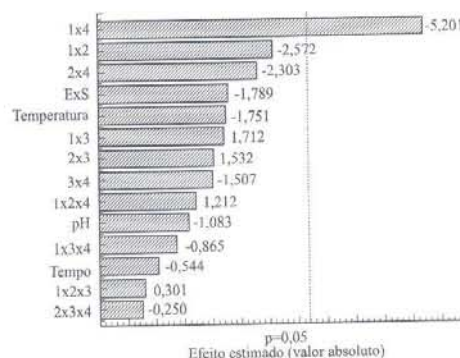
O único efeito significativo sobre o GH da caseína caprina, pela tripsina, foi a interação entre as variáveis pH e relação E:S, como pode ser observado na Figura 2. Observou-se que essa interação apresentou efeito negativo sobre o GH, deste modo, quando o pH aumentou para 8,5 e a relação E:S diminuiu para 1:150

o GH foi favorecido. Schuchert-Shi & Hauser (2009), ao trabalhar com tripsina, observaram que uma alta

**Tabela 2.** Grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó em função das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato (E:S), com utilização da tripsina como enzima proteolítica.

Hidrolisado <sup>(1)</sup>	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	E:S	Grau de hidrólise (%)
1	7,5	40	1	1:150	21,62
2	8,5	40	1	1:150	25,01
3	7,5	50	1	1:150	21,91
4	8,5	50	1	1:150	21,97
5	7,5	40	5	1:150	15,25
6	8,5	40	5	1:150	29,55
7	7,5	50	5	1:150	24,67
8	8,5	50	5	1:150	25,36
9	7,5	40	1	1:100	26,91
10	8,5	40	1	1:100	23,69
11	7,5	50	1	1:100	25,70
12	8,5	50	1	1:100	12,96
13	7,5	40	5	1:100	25,47
14	8,5	40	5	1:100	17,67
15	7,5	50	5	1:100	20,65
16	8,5	50	5	1:100	16,29
17 (C)	8,0	45	3	1:125	16,23
18 (C)	8,0	45	3	1:125	21,34
19 (C)	8,0	45	3	1:125	17,09
20 (C)	8,0	45	3	1:125	17,95

<sup>(1)</sup>Hidrolisados resultantes de dois níveis das variáveis avaliadas e do ponto central (C).



**Figura 2.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato na hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó com tripsina, que tem como variável-resposta o grau de hidrólise. 1, pH; 2, temperatura da hidrólise; 3, tempo de duração da hidrólise; e 4, relação enzima:substrato E:S.



concentração de tripsina não favoreceu a hidrólise das proteínas citocromo c e mioglobulina.

Os resultados obtidos com a hidrólise da caseína caprina pela enzima pepsina estão apresentados na Tabela 3. O maior valor de GH (38,27%) foi obtido nas condições de relação E:S 1:100, pH 3,0, durante 5 horas de hidrólise, a 40°C. A análise estatística dos resultados mostrou que os efeitos pH e tempo, foram positivos e significativos para a hidrólise da caseína caprina com uso da pepsina (Figura 3). Dessa forma, o aumento nos níveis dessas variáveis favoreceu o GH. O pH 3,0, mais elevado, pode ter favorecido a hidrólise enzimática, já que a eficiência do sítio ativo das enzimas é dependente do pH. O maior tempo de hidrólise (5h) também pode ter favorecido o aumento no grau de hidrólise por proporcionar maior duração da reação. Nota-se, ainda, que os dois melhores resultados do GH da caseína caprina também foram alcançados nas condições de pH 3,0 e durante 5 horas de hidrólise. Estes efeitos correspondem aos valores de GH de 38,27 e 37,53% (Tabela 3).

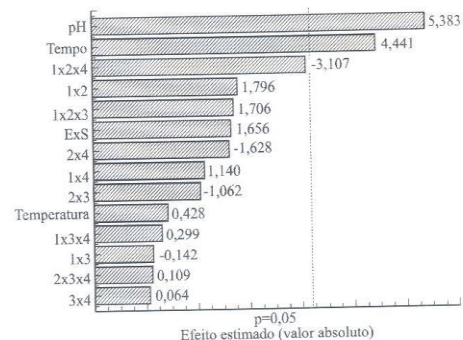
**Tabela 3.** Grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó em função das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato (E:S), com utilização da pepsina como enzima proteolítica.

Hidrolisado <sup>(1)</sup>	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	E:S	Grau de hidrólise (%)
1	2,0	40	1	1:150	4,98
2	3,0	40	1	1:150	9,63
3	2,0	50	1	1:150	5,90
4	3,0	50	1	1:150	25,24
5	2,0	40	5	1:150	25,53
6	3,0	40	5	1:150	17,49
7	2,0	50	5	1:150	10,03
8	3,0	50	5	1:150	37,53
9	2,0	40	1	1:100	4,23
10	3,0	40	1	1:100	27,42
11	2,0	50	1	1:100	10,49
12	3,0	50	1	1:100	19,90
13	2,0	40	5	1:100	21,34
14	3,0	40	5	1:100	38,27
15	2,0	50	5	1:100	15,65
16	3,0	50	5	1:100	32,93
17 (C)	2,5	45	3	1:125	17,20
18 (C)	2,5	45	3	1:125	28,57
19 (C)	2,5	45	3	1:125	25,07
20 (C)	2,5	45	3	1:125	27,42

<sup>(1)</sup>Hidrolisados resultantes de dois níveis das variáveis avaliadas e do ponto central (C).

Os resultados apresentados por Carreira et al. (2003), que utilizaram a pepsina na hidrólise da caseína, mostraram que o emprego da temperatura a 40°C apresenta vantagem para a hidrólise, pois provoca redução dos teores de grandes peptídeos. Os resultados observados por Guo et al. (2009) demonstraram que o melhor GH da caseína ocorre quando uma maior quantidade de protease é adicionada, uma vez que o GH aumentou de 3 para 63%, quando a relação E:S foi aumentada de 0,2 para 1,2 (% m/m). O trabalho realizado por Li et al. (2010), por sua vez, mostrou que quando a relação E:S aumentou de 0,1 para 0,2 mL 100mL<sup>-1</sup>, o GH aumentou de 27,7 para 43,1%. Este trabalho corrobora os resultados encontrados nos três trabalhos acima citados, no que se refere à temperatura empregada e à relação E:S para o maior GH da caseína caprina obtido com a utilização da pepsina.

O perfil da hidrólise foi avaliado por SDS-PAGE (Figura 4). Na linha 7 pode ser observado o perfil das frações  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína do leite de cabra da raça Moxotó. As frações  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseína apresentaram massas molares superiores a 30 kDa. Resultados semelhantes da migração eletroforética foram apresentados por Egito et al. (2006), os quais descrevem também a visualização de uma banda mais intensa da  $\beta$ -caseína no leite de cabra. A fração da  $\beta$ -caseína corresponde



**Figura 3.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato na hidrólise da caseína do leite de cabra da raça Moxotó com pepsina, que tem como variável-resposta o grau de hidrólise. 1, pH; 2, temperatura da hidrólise; 3, tempo de duração da hidrólise; e 4, relação enzima:substrato E:S.

a aproximadamente 60% da caseína caprina (Trujillo et al., 1997).

A eletroforese SDS-PAGE das amostras correspondentes aos menores e maiores graus de hidrólise da caseína caprina obtidos com utilização da pepsina, tripsina e papaína estão representadas pelas linhas 1 a 6 da Figura 4. As linhas 1 e 2 apresentam hidrolisados da caseína caprina com a pepsina, com GH correspondentes a 4,23 e 38,27% dos ensaios 9 e 14 da Tabela 3. As linhas 3 e 4 apresentam os hidrolisados da caseína caprina que utilizaram a tripsina, que corresponderam aos GH 12,96 e 29,55% dos ensaios 12 e 6 da Tabela 2, respectivamente. As linhas 5 e 6, por sua vez, referem-se aos hidrolisados da caseína caprina obtidos pela papaína, com GH de 6,24 e 28,17% dos ensaios 13 e 7 da Tabela 1. Não foi possível diferenciar visualmente os graus de hidrólise para a pepsina e tripsina, pois tanto

o maior como o menor grau de hidrólise apresentam perfis eletroforéticos semelhantes, ao passo que foi possível diferenciar eletroforéticamente o menor e o maior grau de hidrólise da papaína. Porém é nítida a diferença entre as três enzimas utilizadas.

Os produtos da hidrólise da caseína caprina caracterizados pelo SDS-PAGE apresentaram massas molares relativas menores de 30 kDa. Esses resultados corroboram os apresentados por Trujillo et al. (1997), que observaram bandas proteicas resultantes da hidrólise da caseína pela quimosina. Esses autores também observaram bandas com massas molares correspondentes a 14,5 kDa, as quais são equivalentes a para- $\kappa$ -caseína, sendo que os outros peptídeos podem ter sido derivados da  $\alpha_1$ -caseína.

A hidrólise da caseína caprina com a pepsina levou à obtenção apenas de hidrolisados com massas molares inferiores a 14,4 kDa, o que demonstra a eficiência dessa enzima para hidrólise da  $\alpha_1$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína. Soares et al. (2004) relataram que os hidrolisados proteicos de melhor qualidade devem apresentar elevados teores de dipeptídeos e tripeptídeos, assim como de peptídeos com massa molar média de 500 Da. Além disso, devem conter baixos teores de aminoácidos livres e de peptídeos com massa molar superior a 800 Da.

Ao analisar o perfil dos hidrolisados com menor e maior GH da caseína caprina obtidos com a utilização da tripsina, observa-se que essa enzima não promoveu a clivagem completa da  $\beta$ -caseína, mas hidrolisou  $\alpha_1$  e  $\kappa$ -caseína caprina. Contudo, a papaína hidrolisou  $\alpha_1$  e  $\beta$ -caseína caprina, porém não promoveu a clivagem completa da  $\kappa$ -caseína.

### Conclusões

1. As melhores condições de hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó são obtidas com a pepsina, em pH 3,0, com relação E:S de 1:100 e 5 horas de hidrólise a 40°C.

2. A hidrólise da caseína caprina é influenciada positivamente pelo pH e pelo tempo de hidrólise, com o uso da pepsina; observando-se interações significativas antagônicas entre pH e relação E:S, com o uso da tripsina; e entre pH, temperatura e tempo de hidrólise, com o uso da papaína.

3. A pepsina apresenta elevada eficiência na hidrólise de  $\alpha_1$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, evidenciada por hidrolisados com massa molar abaixo de 14,4 kDa.

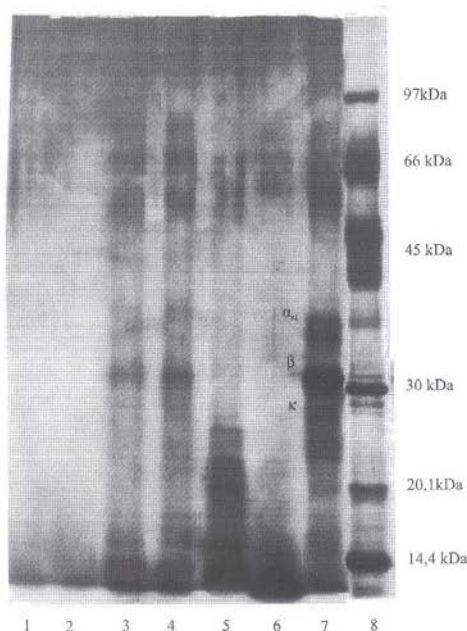


Figura 4. SDS-PAGE (coloração por prata) dos hidrolisados com pepsina (1 e 2), tripsina (3 e 4), e papaína (5 e 6). 7, caseína do leite de cabra da raça Moxotó; 8, padrão de massa molar.



### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Faculdade São Miguel, pelo apoio financeiro.

### Referências

- BIASUTTI, E.A.R. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos**: utilização da subtilisina e da pancreatina. 2006. 88p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite de cabra. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 08 nov. 2000. Seção 1, p.23.
- BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; BARROS NETO, B. de. **Statistical design - chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006. 412p.
- CARREIRA, R.L.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; MOTTA, S. da; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.625-634, 2003.
- CAVALLI, S.V.; SILVA, S.V.; CIMINO, C.; MALCATA, F.X.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v.106, p.997-1003, 2008.
- EGITO, A.S.; ROSINHA, G.M.S.; LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDER, J.M.; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.932-939, 2006.
- FERNANDES, M.F.; QUEIROGA, R. de C.R. do E.; MEDEIROS, A.N. de; COSTA, R.G.; BOMFIM, M.A.D.; BRAGA, A.A. Características físico-químicas e perfil lipídico do leite de cabras mestiças Moxotó alimentadas com dietas suplementadas com óleo de semente de algodão ou de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.703-710, 2008.
- GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.114, p.328-333, 2009.
- HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup> ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
- KRÜGER, C.C.H. **Produção e caracterização química e fisiológica de caseinofosfopeptídeos de leite bovino**. 2006. 149p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZENNEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.1-21, 2000.
- LI, Z.Y.; YOURAVONG, W.; H-KITTIKUN, A. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: a comparative study with commercial proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.166-172, 2010.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MICHAELIDOU, A.M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. **Small Ruminant Research**, v.79, p.42-50, 2008.
- MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M. da S.; LOPES, D.C.F.; OLIVEIRA, M.C. de; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados da caseína. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.1, 2002.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.843-857, 2000.
- OLALLA, M.; RUIZ-LÓPEZ, M.D.; NAVARRO, M.; ARTACHO, R.; CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, v.113, p.835-838, 2009.
- OLIVEIRA, J.C.V. **Caracterização e perfil etnológico de rebanhos caprinos nos Municípios de Ibimirim e Serra Talhada, Estado de Pernambuco**. 2004. 58p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- PEZOA, V.; SALAS-MELLADO, M.M. **Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos, pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado**. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 1979.
- QI, W.; HE, Z.; SHI, D. Product distribution of casein tryptic hydrolysis based on HPLC analysis and molecular mechanism. **Chemical Engineering Science**, v.58, p.767-775, 2003.
- ROCHA, L.L. da; BENÍCIO, R.C.; OLIVEIRA, J.C.V.; RIBEIRO, M.N.; DELGADO, J.V. Avaliação morfoestutural de caprinos da Raça Moxotó. **Archivos de Zootecnia**, v.56, p.483-488, 2007.
- ROSSINI, K.; NOREÑA, C.P.Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.862-867, 2009.
- SANTILLO, A.; KELLY, A.L.; PALERMO, C.; SEVI, A.; ALBENZIO, M. Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. **International Dairy Journal**, v.19, p.655-660, 2009.

SCHUCHERT-SHI, A.; HAUSER, P.C. Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytical Biochemistry*, v.387, p.202-207, 2009.

SOARES, R. Del L.; SILVA, V.D.M.; LOPES, D.C.F.; JUNQUEIRA, R.G.; FIGUEIREDO, A.F. de S.; SILVESTRE, M.P.C. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, p.353-362, 2004.

STATSOFT. *Statistica*: data analysis software systems. Version 8.0. Tulsa: StatSoft, 2008.

SWITZER, R.C.; MERRIL, C.R.; SHIFRIN, S. Highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.98, p.231-237, 1979.

TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; CARRETERO, C. Proteolysis of goat casein by calf rennet. *International Dairy Journal*, v.7, p.579-588, 1997.

VARGHESE, G.; DIWAN, A.M. Simultaneous staining of proteins during polyacrylamide gel electrophoresis in acidic gels by counter migration of Coomassie brilliant blue R-250. *Analytical Biochemistry*, v.132, p.481-483, 1983.

---

Recebido em 4 de maio de 2010 e aprovado em 30 de julho de 2010

<b>Assunto:</b>	[QN] - Submissão Temporária - tmp tmp_9796
<b>De:</b>	sbqedit@iq.usp.br (sbqedit@iq.usp.br)
<b>Para:</b>	villsb@yahoo.com.br;
<b>Data:</b>	Segunda-feira, 19 de Março de 2012 16:18

REF.: tmp tmp\_9796

Prezado Prof. Bezerra, Vilma

Obrigado por submeter seu manuscrito "DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DA CASEÍNA DO LEITE DE CABRA MOXOTÓ (Capra hircus Linnaeus, 1758) OBTIDOS PELA AÇÃO DA PAPAÍNA" para publicação na Química Nova, QN.

O NÚMERO TEMPORÁRIO é: tmp\_9796 tmp.

Assim que o seu arquivo PDF for verificado, o seu manuscrito será inserido no sistema, e você receberá um outro e-mail com o NÚMERO DE REFERÊNCIA, confirmando assim a submissão.

Caso você tenha alguma outra dúvida a respeito desta submissão, por favor, entre em contato com a Gerente Editorial da QN no e-mail: [sbqedit@iq.usp.br](mailto:sbqedit@iq.usp.br).

Atenciosamente,

Pricila Gil  
SBQ - gerente editorial  
Caixa Postal: 26037  
05513-970 São Paulo – SP  
Tel.: +55.11.30322299  
Fax.: +55.11.38143602  
web: <http://quimicanova.s bq.org.br>  
e-mail: [sbqedit@iq.usp.br](mailto:sbqedit@iq.usp.br)

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DA CASEÍNA DO LEITE DE CABRA MOXOTÓ (*Capra hircus Linnaeus, 1758*) OBTIDOS PELA AÇÃO DA PAPAÍNA**

Artigo submetido à **Revista Química Nova**

**Fator de Impacto: 0.910 JCR 2007**



**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DA  
CASEÍNA DO LEITE DE CABRA MOXOTÓ (*Capra hircus Linnaeus, 1758*)  
OBTIDOS PELA AÇÃO DA PAPAÍNA**

**Vilma Sobral Bezerra\*, Roberto Afonso da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto**

Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e  
Fisiologia Animal, Av. Manoel de Medeiros, s/n.º Dois Irmãos, CEP 52171-900  
Recife

**Julia Furtado Campos**

CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste)- Av. Prof. Luiz Freire,  
01. Cidade Universitária- CEP 50740-540. Recife, PE

**Tatiana Souza Porto**

Universidade Federal Rural de Pernambuco- Unidade Acadêmica de Garanhuns- Av.  
Bom Pastor Sn.º CEP 55292-270, Garanhuns, PE

**José Luiz de Lima Filho**

Universidade Federal de Pernambuco – Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami  
– Avenida Prof. Moraes Rêgo s/n.º Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE.

## **DETERMINATION OF PEPTIDE PROFILE AND AMINO ACID SEQUENCE OF CAPRINE CASEIN HYDROLYSATES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY.**

This study aims to determine caprine casein hydrolysates peptide profile, obtained by papains hydrolysis. A full  $2^2$  factorial design with four axial points was used to assess kinetic effects in casein hydrolysis and antioxidant activity. The hydrolysis degree was determined by the ratio between total soluble proteins and casein. Antioxidant activity was evaluated by ABTS method, with Trolox as standard. Peptide profile was obtained by MALDI-TOF. The highest degree of hydrolysis (28.5%) and antioxidant activity (2329.6  $\mu\text{mol.L}$  of TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  peptide) values were obtained in permeate, whose peptides (NENLL, NPWDQVK and LLYQEPVLGPV) have the potential for being used in food supplements and / or pharmaceuticals.

Keywords: bioactive peptides, caprine casein, antioxidant activity

### **INTRODUÇÃO**

No Brasil, a produção de cabras é muito importante para agropecuária e economia local, uma vez que estes animais apresentam-se como provedores de leite e carne bastante consumidos por populações mais carentes.<sup>1</sup> Caprinos da raça Moxotó são originários do Vale do Moxotó, Pernambuco, caracterizam-se por ser facilmente adaptáveis ao clima semi-árido, são profílicos e resistentes. Silva e Araújo<sup>2</sup> demonstraram que o aproveitamento do leite caprino Moxotó para nutrição humana e produção de derivados ainda é pouco explorado. Entretanto, devido às características nutricionais benéficas, como a elevada concentração de proteínas de alto valor nutritivo e a possível utilização desse leite por pessoas alérgicas ao leite de vaca,<sup>3</sup> torna-se um atrativo a utilização de peptídeos obtidos de proteínas de leite caprino na indústria de alimentos da região.

A caseína constitui-se na principal proteína do leite, representando 80% das proteínas totais.<sup>4</sup> No leite de cabra, estas apresentam teores de 4 a 26% de  $\alpha_{s1}$ -caseína, 42-64% de  $\beta$ -caseína e 20 a 24% de  $\kappa$ -caseína.<sup>4</sup> Esta encontra-se inativa e latente na sequência primária da proteína, necessitando da ação de enzimas proteolíticas para liberação de peptídeos ativos.<sup>5</sup>

Na indústria de produtos lácteos, o uso de enzimas proteolíticas de origem animal, vegetal ou microbiana influenciam o produto final de hidrólise, definindo a produção de peptídeos bioativos, uma dessas enzimas é a papaína.<sup>6</sup>

A papaína constitui-se uma cisteíno protease de origem vegetal que demonstra eficiência na hidrólise de proteínas lácteas, o qual atua na hidrólise de substratos contendo resíduos de lisina, arginina ou valina, sendo estável a altas temperaturas, apresentando pH ótimo de atividade entre 6,0 e 7,5.<sup>7</sup>

Para melhorar as propriedades funcionais e biológicas de hidrolisados enzimáticos de proteínas do leite faz-se necessário controlar as condições cinéticas durante a proteólise, através da determinação do grau de hidrólise (GH).<sup>8</sup> Este parâmetro quantitativo da reação de proteólise pode ser usado para comparar hidrolisados entre si. Pode ser definido como a percentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao total de ligações peptídicas.<sup>8</sup>

Hidrolisados enzimáticos de caseína de várias espécies foram relatados por exibir diversas atividades biológicas, dentre as quais destaca-se as propriedades antitrombóticas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, antibacterianas, carreadoras de minerais, hipocolesterolêmicas e antioxidantes.<sup>9-13</sup> No entanto não foram encontrados relatos dessas atividades com a caseína do leite de cabra Moxotó. Adicionalmente, a alta variabilidade genética desta raça, associado ao controle dos

parâmetros cinéticos, indicam a possibilidade da produção de diferentes peptídeos com propriedades bioativas.<sup>2</sup>

Várias técnicas para avaliação, fracionamento e identificação de peptídeos obtidos de hidrolisados proteicos têm sido investigadas.<sup>11-13</sup> Entre estas técnicas a de ultrafiltração seguida por análise do perfil peptídico por espectrometria de massa MALDI-TOF- MS/MS, apresentam a vantagem de diminuir o custo analítico e o tempo de análise, permitindo uma avaliação precisa de peptídeos bioativos.<sup>13</sup>

O objetivo deste trabalho foi determinar a sequência de aminoácidos de peptídeos antioxidantes, obtidos pela hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó, pela ação da papaína, usando a técnica da ultrafiltração e espectrometria de MALDI-TOF- MS/MS.

## PARTE EXPERIMENTAL

### **Materiais**

Todos os reagentes foram de grau analítico. As amostras de leite de cabra foram coletadas de um animal puro da raça Moxotó, proveniente do Município de Sertânia, Pernambuco. Estas foram congeladas imediatamente após a coleta em nitrogênio líquido, e mantidas a -20 °C até o uso.

### **Extração da caseína caprina**

A extração da caseína foi realizada por precipitação isoelétrica a pH 4,6, segundo Egito *et al.*,<sup>14</sup> exceto pela retirada do tolueno. O precipitado da caseína foi solubilizado com 1 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH até pH 7,0 e submetido à diálise contra água deionizada a 4 °C por 96 horas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Soluções

contendo a 2% de caseína ressuspensa em solução tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  foram submetidas a hidrólise usando papaína (EC. 3.4.22.2) (SIGMA Aldrich- St. Louis MO, USA), de acordo com as variáveis estabelecidas através de planejamento fatorial.

Após a hidrólise, as amostras foram submetidas à agitação por 30 segundos e posteriormente colocadas em banho-maria a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos para inativação da enzima e submetida a centrifugação a  $12000 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para determinação do grau de hidrólise e para o tratamento da ultrafiltração.

### **Planejamento experimental**

O efeito das variáveis independentes tempo e relação enzima: substrato (E:S) sobre as variáveis dependentes, grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante foram realizados de acordo com o planejamento fatorial completo  $2^2$ , com 4 pontos fatoriais (níveis  $\pm 1$ ), 2 pontos centrais (nível 0) e 4 pontos axiais ( $\pm \alpha$ ), totalizando 10 ensaios, segundo Bruns *et al.*<sup>15</sup> O pH 6,5 e a temperatura de reação foram mantidos a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  conforme estabelecido por Lira *et al.*<sup>16</sup> A Tabela 1 mostra as variáveis e os níveis estudados para obtenção do grau de hidrólise e atividade antioxidante da caseína caprina usando a papaína. A significância dos dados foi analisada pelo programa Statistica 8.0 ( $P < 0.05$ ) (Statsoft INC.<sup>17</sup>)

INSERIR TABELA 1 AQUI

### **Determinação do Grau de Hidrólise (GH) da caseína caprina**

A determinação do GH da caseína usando a enzima papaína foi realizada de

acordo com a metodologia adaptada de Centenaro *et al.*<sup>18</sup> O GH foi expresso segundo a relação entre as quantidades de proteínas solúveis determinadas pelo método de Lowry *et al.*,<sup>19</sup> usando albumina de soro bovino (BSA) - (Sigma, St. Louis MO, USA) na preparação da curva de calibração de proteínas totais presentes na caseína, determinadas pelo método de Kjeldahl pela Official Methods of Analysis-AOAC.<sup>20</sup>

### **Separação dos hidrolisados da caseína caprina por ultrafiltração**

Os sobrenadantes dos hidrolisados da caseína com a papaína foram submetidos à ultrafiltração usando-se uma membrana da AMICON (Millipore-Canadá) com porosidade (*cut off*) de 3000 Da, em seguida centrifugados a 12000 x.g durante 40 minutos, os quais obtiveram-se duas frações protéicas: os peptídeos contidos no retentado (>3000Da) e no permeado (<3000Da), os quais foram usados para determinação da atividade antioxidante.

### **Atividade antioxidante dos hidrolisados da caseína caprina**

A atividade antioxidante foi determinada utilizando radical ABTS<sup>+</sup> [2,2 -cation azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] como descrito por Re *et al.*<sup>21</sup> O ABTS foi dissolvido em álcool etílico (Merck-Alemanha) para obtenção da concentração de 7 mmol.L.<sup>-1</sup> A reação de oxidação foi realizada com uso de persulfato de potássio 2,45 mmol.L.<sup>-1</sup>, por 16 horas no escuro. As amostras de hidrolisados correspondiam ao *pool* de peptídeos, permeado (<3000Da) e retentado (>3000Da) que foram diluídas em concentrações variando entre 0,01 a 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína e usadas para os ensaios de determinação da atividade antioxidante. A reação consistia na adição de 30 µL da amostra de peptídeo a 3,0 mL do radical

ABTS<sup>+</sup> seguida da leitura da absorbância (734 nm) em espectrofotômetro (MICRONAL, modelo B582, São Paulo, Brasil) após 6 minutos do início da reação. O TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametichromano-2-carboxílico, padrão de referência) foi usado como padrão. A porcentagem de inibição foi calculada em função da concentração de antioxidantes e TROLOX, como a Capacidade Antioxidante Equivalente a TROLOX (TEAC) em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  de peptídeo.

### **Perfil e sequenciamento de peptídeos do permeado (<3000Da) e retentado (>3000Da) obtidos por MALDI -TOF MS\MS**

O perfil peptídico usando a papaína foi determinado nas amostras do permeado (<3000Da) e retentado (>3000Da) que apresentaram os maiores graus de hidrólise e atividades antioxidantes, através da técnica da espectrometria de massa MALDI-TOF- MS\MS. A matriz utilizada para realização dos experimentos foi o ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico em acetonitrila 33% e ácido trifluoroacético 0,1%, usando um Aparelho AuToFlex III (Bruker Daltonics Inc, USA), na faixa de massa de 0,5 a 3 KDa para os peptídeos do permeado (<3000Da) e de 1000 a 1000KDa para os peptídeos contidos no retentado (>3000Da). Uma mistura de peptídeos-padrão (Peptidemix-Bruker Daltonics Inc, USA) foi utilizada para calibração do espectrômetro de massa. As sequências -y e -b dos aminoácidos foram obtidas através da fragmentação dos peptídeos e analisadas pelo programa Flex Analysis-BRUKER Daltonics Inc. (USA). As sequências de aminoácidos foram comparadas com sequências de aminoácidos contidos em banco de dados NCBI-Blast, os quais

continham as sequências padrões de diversas proteínas para confirmação dos peptídeos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Hidrólise enzimática da caseína caprina utilizando papaína

A influência do tempo reação e da relação E:S no aumento do grau de hidrólise e atividade antioxidante da caseína caprina usando papaína está descrita na Tabela 2. Esse modelo inclui dois efeitos principais e uma interação entre esses efeitos. As estimativas estatisticamente significativas dos efeitos foram realizadas ao nível de confiança de 95%.

INSERIR TABELA 2 AQUI

Ambas variáveis investigadas exerceram influência sobre o GH, mostrando efeitos significativos sobre a relação E:S e tempo de reação. O tempo linear exerceu um efeito positivo sobre o GH, significando que os maiores níveis desta variável proporcionaram maiores graus de hidrólise da caseína. No entanto, a relação E:S (Q) exerceu efeito negativo e significativo sobre o GH, nas condições testadas. Isso significa que a diminuição na relação E:S de 1:100 para 1:200 favoreceu o GH. Este resultado está de acordo com os obtidos por Lira *et al.*,<sup>16</sup> que demonstraram a influência de parâmetros cinéticos na hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó usando a papaína e observou que a E:S influenciava de forma negativa o GH da caseína caprina. Entretanto, não ocorreu o mesmo quando a E:S passou de 1:150 para 1:200, mostrando que o nível intermediário é o responsável pelo maior GH. Vale salientar que o tempo quadrático foi o efeito mais significativo sobre o GH, o



que nos permite afirmar que a diminuição do tempo de reação favorece um acréscimo neste parâmetro. Entretanto, observou-se que a interação entre os fatores mostrou-se positiva.

Os resultados para o grau de hidrólise da caseína caprina usando a papaína estão apresentados na Tabela 1. Os melhores valores de GH obtidos foram de 28,5% usando-se relação E:S 1:150 e tempo de reação de 5h, os quais foram obtidos no ensaio 10. Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Lira *et al.*<sup>16</sup> quando usaram a papaína para hidrólise da caseína caprina e obtiveram um GH de 28,18% usando-se as mesmas condições aqui testadas. Por outro lado, o GH obtido neste trabalho diferiu daquele apresentado por Zhang *et al.*<sup>22</sup> os quais obtiveram GH de até 10,2 % ao usar a papaína para hidrolisar a caseína bovina, em pH 7,0, relação E:S de 1:100, temperatura de 55 °C e até 24 horas de reação. Já, as pesquisas de Zhao, Wu e Li<sup>23</sup> obtiveram um GH de até 32,45% quando trataram a caseína bovina com a papaína em 4 por horas de reação. O aumento do GH maximiza a produção de hidrolisados contendo pequenos peptídeos ou aminoácidos livres, o que representa um importante aspecto para a produção de hidrolisados protéicos com propriedades bioativas.<sup>24-27</sup> No entanto, uma hidrólise extensiva pode ser prejudicial, pois podem ser produzidos pequenos peptídeos e aminoácidos livres que não apresentam as propriedades importantes para os peptídeos de caseína apresentar bioatividade.<sup>28</sup>

Zhang *et al.*<sup>22</sup> realizaram a hidrólise da caseína bovina com papaína usando 1:100, temperatura de 55 °C, pH 7,0 por tempos reação de até 24h, com o objetivo de estimular o crescimento de culturas de micro-organismos presentes no hidrolisado protéico. Adicionalmente, Cavalli *et al.*<sup>28</sup> mostraram que a digestão do caseinato de sódio do leite de cabra, hidrolisada com enzimas de extrato de *Staphilococcus*

*marianum*, a pH 6,5 após 1 hora de digestão, tornou-se intensa com o decorrer do tempo de reação. Isso significa que nestas condições quanto maior o tempo de reação maior o grau de hidrólise, o que foi confirmado neste trabalho que testou o GH em pH 6,5, durante 5h. Entretanto, a hidrólise por tempo superiores a 5 horas propicia uma contaminação microbiológica.<sup>29</sup>

### **Avaliação da atividade antioxidante de hidrolisados da caseína caprina**

Os efeitos dos parâmetros tempo de reação e relação enzima: substrato (E:S) sobre a atividade antioxidante é mostrada na Tabela 2. No *pool* de peptídeos, os parâmetros investigados não exerceram efeitos significativos sobre a atividade antioxidante. Já nos peptídeos presentes no permeado (<3000Da), os fatores tempo e relação E: S quadráticos foram negativos e os mais significativos sobre a atividade antioxidante. Entretanto, observou-se que os níveis intermediários de tempo e E: S foram mais favoráveis a atividade antioxidante. Esses fatores apresentarem sinais negativos explicaria a concavidade da curva no gráfico da superfície de resposta voltado para baixo.

A investigação da influência dos fatores tempo e E:S na atividade antioxidante dos peptídeos presentes no retentado (>3000Da), mostraram que a relação E:S linear e quadrática apresentaram efeitos opostos sobre a atividade antioxidante. Enquanto, a relação E:S linear foi positiva, o efeito quadrático foi negativo. Por outro lado, observou-se que a menores tempos de reação e maiores relações E:S(Q) levaram a maiores atividades antioxidantes. Entretanto, essa afirmativa só é verdadeira até o tempo e relação E:S intermediários, os quais obtiveram-se maiores atividades biológicas. Dessa forma, podemos afirmar que na relação E:S 1:100 e tempo de reação de 3 horas, o poder antioxidante foi menor que a relação E:S

1:200, ao mesmo tempo de reação. Esses resultados diferiram dos obtidos por Morais *et al.*,<sup>25</sup> quando mostraram que a relação E:S influencia a hidrólise da caseína bovina com uso de papaína, ao demonstrarem que uma alteração da relação E:S de 2 para 4 % diminui os níveis de di- e tri-peptídeos e aumenta o teor de aminoácidos livres e de peptídeos médios como oligopeptídeos, sendo estes últimos, os principais responsáveis pelas atividades biológicas. Isso dificulta o emprego desses hidrolisados em escala industrial, pois seria necessário aumentar a quantidade de enzima para ter peptídeos com propriedades funcionais ou bioativas, o que elevaria o custo de produção.

Os resultados da atividade antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó estão apresentados na Tabela 1. A capacidade antioxidante dos hidrolisados de caseína caprina usando a papaína variou entre 349,2 e 2329,6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  de peptídeo. O maior poder antioxidante dos hidrolisados da caseína caprina com papaína foi obtido para os peptídeos presentes no permeado, após 5 horas de reação e relação E:S de 1:150.

Hidrolisados da caseína ovina e caprina têm sido estudados por apresentar atividade antioxidante. Silva, Philanto e Malcata<sup>27</sup> e Gomez-Ruiz *et al.*<sup>30</sup> mostraram que o queijo preparado com leite de cabra ou ovelha usando protease de *Cynara cardunculus* e hidrolisados da caseína ovina digeridos com papaína, respectivamente são fontes de peptídeos com atividades biológicas, inclusive a atividade antioxidante.

O poder antioxidante do hidrolisado de caseína caprina com a papaína neste trabalho foram maiores que os obtidos por Gomez-Ruiz *et al.*<sup>30</sup> quando investigaram hidrolisados da caseína ovina e obtiveram até 1630  $\text{mg.mL}^{-1}$ , o que equivale a cerca de 0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  de peptídeo. Adicionalmente, também foram

superiores aos obtidos por Clausen *et al.*<sup>31</sup> que obtiveram uma atividade antioxidante para  $\beta$ -caseína bovina de  $0,08 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  de proteína. Os resultados obtidos deste trabalho foram similares àqueles obtidos por Contreras *et al.*<sup>29</sup> que obtiveram atividade antioxidante de  $2321 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de TROLOX/ $\text{mg}^{-1}$  de proteína após ultrafiltrar com membrana de (3000Da) os hidrolisados de proteínas do leite usando a enzima microbiana *termolisina*.

Os resultados de TEAC para os peptídeos de caseína caprina foram comparados a antioxidantes naturais empregados na indústria de alimentos como aditivos. Esta comparação indica que estes peptídeos da caseína do leite caprino, apresentam capacidade antioxidante superior a alguns vinhos e padrões de atividade antioxidante como o BHA (3-terc-butil-4-hidroxianisol), o  $\alpha$ -tocoferol e a vitamina C, os quais demonstram poder antioxidante próximo a  $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  após 6 minutos de reação.<sup>32-34</sup>

Para avaliar a influência da massa molecular dos peptídeos presentes nos hidrolisados da caseína caprina com uso da papaína sobre as atividades biológicas, as amostras foram submetidas ao processo de ultrafiltração. Este se constitui um processo de separação de peptídeos de acordo com a massa molecular.<sup>35</sup> Pode ser usado para obtenção de pequenos peptídeos, visando melhorar a qualidade biológica de hidrolisados protéicos.<sup>35</sup> A maior parte das atividades biológicas da caseína encontram-se em oligopeptídeos, tripeptídeos ou dipeptídeos que podem ser obtidos com a utilização de uma membrana de ultrafiltração com porosidade adequada.<sup>35</sup> Usa-se membranas com porosidade entre 1000 a 3000 Da, as quais permitem a separação de peptídeos de baixo peso molecular, daqueles de alto peso molecular.<sup>35</sup> A investigação dos resultados obtidos para a média dos ensaios 9 e 10, demonstraram que a atividade antioxidante, no pool de peptídeo foi de 1627,35

$\mu\text{mol.L}^{-1}$  TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  de peptídeo. Após a ultrafiltração obteve-se um TEAC médio de 2334,0 e 1999,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  TROLOX. $\text{mg}^{-1}$  de peptídeo, respectivamente para os peptídeos do permeado (<3000Da) e retentado (>3000 Da). Percebeu-se que o procedimento de ultrafiltração contribuiu favoravelmente para atividade antioxidante, uma vez que essa atividade foi maior nos peptídeos do permeado (<3000 Da) que para os peptídeos do retentado (>3000Da). Lacroix *et al.*<sup>36</sup> obtiveram resultados semelhantes, quando utilizaram a ultrafiltração através de membranas para recuperação de produtos bioativos de baixo peso molecular com melhor valor nutricional. Estes peptídeos foram ricos em di- e tripeptídeos e apresentaram menor caráter antigênico. Entretanto, os resultados aqui apresentados contradizem os achados de Carreira *et al.*,<sup>37</sup> os quais empregaram a ultrafiltração para obtenção de hidrolisados protéicos de caseína com qualidade funcional e não melhorou a produção de peptídeos bioativos com o emprego desse processo.

A ação antioxidante dos hidrolisados de caseína caprina nas condições analisadas, refere-se à presença de peptídeos ricos em aminoácidos como histidina, lisina, prolina e tirosina<sup>38</sup> que foram demonstradas em parte nos peptídeos encontrados no sequenciamento de aminoácidos por análise em MALDI-TOF-MS/MS. Além disso, a atividade antioxidante de hidrolisados da caseína caprina também pode está relacionado ao GH, bem como a origem e especificidade da enzima usada na digestão proteolítica. A papaína é uma cisteína protease, que atua especificamente sobre aminoácidos básicos como a lisina, a arginina e a histidina, induzindo a mudanças estruturais e conformacionais que levam a produção de inúmeros peptídeos com propriedades bioativas. Entretanto, a extensão da proteólise depende da acessibilidade da protease as ligações peptídicas, bem como às condições hidrolíticas.<sup>39</sup>

A atividade antioxidante dos hidrolisados da caseína caprina com a papaína é um atributo que pode ser usado para proteger sistemas biológicos contra o dano causado pelo estresse oxidativo das células. Assim, esses hidrolisados proteicos com atividade antioxidante podem ser usados na indústria de alimentos para diminuir reações de oxidação que levam a deterioração de alimentos. Adicionalmente, hidrolisados da caseína caprina podem constituir uma fonte de substâncias funcionais portadoras de antioxidantes naturais, pois não apresentam os efeitos colaterais tóxicos associados aos equivalentes sintéticos e ainda podem conferir valor nutricional a alimentos, o que representa uma vantagem adicional ao uso dos antioxidantes sintéticos.<sup>25</sup> Entretanto, estudos devem ser realizados no intuito de entender mais precisamente, os mecanismos de ação desses peptídeos obtidos da caseína do leite de cabra da raça moxotó, portador de propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, possibilitando o seu emprego na indústria de alimentos, agregando valor para um insumo regional (leite) e estimular o desenvolvimento de alimentos funcionais para a indústria local.

#### **Perfil peptídico e sequenciamento de aminoácidos de hidrolisados da caseína obtido por MALDI-TOF-MS/MS.**

O perfil peptídico da caseína caprina foi obtido para hidrolisados de caseína caprina com uso da papaína nas amostras submetidas à ultrafiltração. As amostras do permeado (<3000 Da) e retentado (>3000Da) que apresentaram os maiores GH (28,3%) e atividades antioxidantes foram usadas para investigação do perfil peptídico. Compararam-se os perfis peptídicos dos hidrolisados de caseína caprina com hidrolisados de caseína de outras espécies, a fim de prever as propriedades biológicas.<sup>29,30</sup> De acordo com as Zhang *et al.* e Farvin *et al.*<sup>40, 41</sup> nos peptídeos

contidos no permeado (<3000 Da) 12 dos 22 peptídeos determinados na hidrolisado proteico de caseína caprina foram descritos por apresentar propriedades biológicas ou funcionais (Figura 1). Nos peptídeos contidos no retentado (>3000 Da) foram detectados 11 peptídeos. Entretanto, nenhum desses foram descritos por apresentar propriedades biológicas (Tabela 3).

INSERIR FIGURA 1 AQUI

INSERIR TABELA 3 AQUI

O peptídeo de massa molecular 1268 Da, também foi encontrado por Gomez-Ruiz *et al.*,<sup>30</sup> os quais evidenciaram poder antioxidante. Este, após sequenciamento demonstrou correspondência com a fração INNQFLPYPY da caseína. Ademais, o peptídeo de massa molecular 759 Da foi sequenciado (Figura 2A), o qual obteve-se NENLL, correspondente a fração f(17-21) da  $\alpha_{s1}$ -caseína. Este foi previamente identificado por Alli *et al.*<sup>42</sup> que identificaram os peptídeos com as sequências QEVLNE, NLLRF, NENLL, NENLLRF originários da  $\alpha_{s1}$ -caseína. Estes peptídeos aqui descritos são necessários ao flavor e outras propriedades funcionais do queijo Cheddar. Estes peptídeos podem ser obtidos a partir da sequência HPINHQGLSPEVPNENLL, o qual constitui uma parte da fração f(1-23) da  $\alpha_{s1}$ -caseína caprina. Esse peptídeo foi previamente identificado por Hill *et al.*,<sup>43</sup> os quais demonstraram propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras e anti-hipertensivas.

O peptídeo de massa molecular 886 Da apresentou a sequência NPWDQVK, o qual se refere à fração f(123-129) da  $\alpha_{s2}$ -caseína (Figura 2B). Saito *et al.*<sup>44</sup> e Gomez-Ruiz *et al.*<sup>30</sup> obtiveram peptídeos da caseína com essa massa molecular. Entretanto

nesses peptídeos, não foram encontradas o efeito antioxidante como descrito no presente trabalho. No entanto, observou-se propriedades anti-hipertensivas.<sup>26</sup>

Para o peptídeo de massa molecular 1384 Da (figura 2C) obteve-se a seqüência LLYQEPVLGPV, a qual refere-se a fração f(191 -206) da  $\beta$ -caseína, os quais foram semelhantes aos obtidos previamente por Contreras *et al.*<sup>29</sup> e Alli *et al.*<sup>42</sup> quando investigaram o perfil peptídico de caseína de leite ovino e queijo cheddar bovina, respectivamente.

INSERIR FIGURA 2A, 2B e 2C AQUI

Além das sequencias determinadas, pôde-se a partir da razão massa/carga obtida por espectrometria de massa (MALDI TOF-MS\MS), predizer propriedades bioativas de alguns peptídeos presentes no permeado (<3000Da). Os peptídeos de massa molecular 550 e 647 Da obtidos foram previamente descritos como fragmento da  $\kappa$ -caseína, os quais correspondem às frações (f61-65) e (f61-65), respectivamente. Estas se referem às sequências YAKPA e YAKPVA, descritas anteriormente por apresentar propriedades antioxidantes.<sup>29, 41</sup> O peptídeo de massa 656 Da, anteriormente descrito por Gomez-Ruiz *et al.*,<sup>42</sup> ao estudar o perfil peptídico de hidrolisados da caseína ovina usando a técnica HPLC-MS\MS, demonstraram propriedades anti-hipertensivas e antimicrobiana. O peptídeo de massa molecular 672 Da obtido nesse trabalho, foi descrito previamente por Gomez-Ruiz *et al.*,<sup>45</sup> o qual obteve-se a seqüência GLDIQK, que se refere a um fragmento da caseína, o qual constatou-se propriedades anti-hipertensivas. O peptídeo de massa molecular 760 Da identificado neste trabalho, foi anteriormente descrito por Santillo *et al.*<sup>3</sup> ao pesquisarem propriedades antioxidantes de caseína caprina hidrolisada com



proteases endógenas. Nesse estudo<sup>3</sup> demonstrou-se que a fração proteica em questão, consistia na  $\alpha_2$ -caseína f(205–223) e o sequenciamento deste peptídeo, demonstrou a sequência K.AMKPWTQPKTNAIPYVRY, a qual foi determinada propriedades anti-hipertensivas. Entretanto, esse peptídeo não foi sequenciado no presente estudo.

Alguns peptídeos identificados neste trabalho, com hidrolisados da caseína caprina com papaína, obtidos em pH 6,5, relação E:S 1: 150 e tempo de reação de 5,0 h, foram previamente obtidos em caseínas extraídas de queijo, as quais apresentaram propriedades funcionais.<sup>43</sup> Nesse trabalho, os peptídeos no permeado (<3000Da) apresentaram massas moleculares de 760, 806, 887 e 970 Da. Os peptídeos de massa molecular 887, 970 e 978Da também foram obtidos em hidrolisados da caseína bovina por Saito *et al.*,<sup>44</sup> Gomez-Ruiz *et al.*,<sup>45</sup> Gomez-Ruiz *et al.*,<sup>30</sup> os quais demonstraram características anti-hipertensivas e antioxidantes.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados desse trabalho possibilitaram estabelecer as melhores condições de hidrólise para a caseína do leite de cabra Moxotó com o uso da papaína. O tratamento de ultrafiltração mostrou-se eficiente na separação de peptídeos com poder antioxidante, compatível a antioxidantes naturais, como a vitamina C e  $\alpha$ -tocoferol. O perfil peptídico e o sequenciamento dos peptídeos evidenciaram nos peptídeos propriedades antioxidantes devido a aminoácidos específicos como histidina, lisina, prolina e tirosina, o que possibilita seu uso na produção de alimentos funcionais e aditivos na conservação de alimentos.

## **Agradecimentos**

A CAPES, CNPq, FACEPE pelo apoio financeiro e ao CETENE pela realização da análise de MALDI TOF MS e a Faculdade São Miguel.

## REFERÊNCIAS

1. Haenlein, G. F. W.; *Small Ruminant Res.* **2004**, 51, 1, 155.
2. Silva, F. L. R.; ARAÚJO, M. R. A.; *In Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.* **2000**, 37. Viçosa. Minas Gerais-CD ROM.
3. Santillo, A., A. L.; Kelly, B, C.; Palermo, C. A.; Sevi, A. M.; Albenzio, L. *Int. Dairy J.* **2009**, 19, 655.
4. Clark, S.; Sherbon, J. W. *Small Ruminant Res.* **2000**, 38, 135.
5. Rossini, K.; Norenã, C. P. Z.; Cladera-Olivera, F.; Brandelli, A. *LWT - Food Sci. Technol.* **2009**, 42, 862.
6. Morato, A. F.; Carreira, R. L.; Junqueira, R. G.; Silvestre, M. P. C.; *J. Food Comp. Anal.* **2000**, 13, 3, 101.
7. Ghosh, S.; *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, 264, 6.
8. Biasutti, E. A., Afonso, W. O.; Lopes, C. O.; Coelho, J. V.; Silva, V. D. M; Silvestre, M.P.C.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2008**, 44, 51.
9. Li, Z.Y.; Youravong, W.; H-Kittikun, A. *Food Sci. and Technol.* **2010**, 43, 1, 166.
10. Olalla, M.; Ruiz-López, M. D.; Navarro, M.; Artacho, R.; Cabrera, C.; Giménez, R.; Rodríguez, C.; Mingorance, R. *Food Chem. [S.I.]* **2009**, 113, 835.
11. Chicón, R.; Belloque, J.; Alonso, E.; López-Fandiño, R. *Food Hydrocolloids.* **2009**, 23, 3, 593.
12. Je, J.-Y., Qian, Z.-J., Byun, H.-G., Kim, S-K. *Process Biochem.* **2007**, 42, 840.
13. Birkemo, G. A.; O'Sullivan, O.; Ross, R. P.; Hill, C. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, 106, 1, 233.

14. Egito, A. S. ; Rosinha, G. M. S. ; Laguna, L. E. ; Miclo, L. ; Girardet, J. M. ; Gaillard, J. L. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2006**, 58, 5, 932.
15. Bruns, R. E.; Scarminio, I. S; Neto Barros. B. *Statistical Design-Chemometrics*; 1th ed., Elsevier: Amsterdam, **2006**.
16. Lira, T. B. F.; Bezerra, V. S.; Silva, F. O.; Dias, G. M. P.; Lima Filho, J. L.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F. *Pesqui. Agropec. Bras.* **2010**, 45, 9, 1036.
17. Statsoft INC. *Statistica (data analysis software systems) version 8.0.* **2008**
18. Centenaro, G. S.; Prentice-Hernández, C.; Salas-Mellado, M. *Quim. Nova.* **2009**. 32, 7, 1792.
19. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R.J.; *Journal Biol. Chem.* **1951**, 193, 265.
20. *Official methods of analysis of AOAC.* Horwitz, W. (ED.). International. 17 th ed. Gaithersburg: AOAC international, **2000**.
21. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Panala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, 26, 1231.
22. Zhang, L.; Li, J.; Zho, U, K. *Bioresour Technol.* **2010**, 101, 2084.
23. Zhao, X. H.; Wu, D.; Li, T. J. *Dairy Sci. Technol.* **2010**, 90, 521.
24. Yin, S.W.; Tang, C. H.; Cao, J. S.; Hu, E. K.; Wen, Q. B.; Yang, X. Q.; *Food Chem.* **2008**, 106, 1004.
25. Moraes, H. A.; Barbosa, C. M. S.; Lopes, D.C. F. Oliveira, M. C.; Silvestre, M. P. C. *Arch. Latinoam. Nutr.* [S.l]. **2002**, 52, 1, 77.
26. Chataud, J.; Desreumeux, S.; Cartwright, T. Laboratoire Roger Bellon. France, **1988**. (A23j3-00FR87402837.6.0.274946A1)
27. Silva, S. V.; Pihlanto, A.; Macalcata, X. F. *J. Dairy Sci.* **2006**, 89, 3336.

28. Cavalli, S. V. Sofia V. Silva, C. C., Malcata, F. X.; Priolo, N. *Food Chem.* **2008**, 106, 997.
29. Contreras, M. M.; Hernández-Ledesma, B.; Amigo, L.; Martín-Álvarez, P. J.; Recio, I. *LWT - Food Sci. Technol.* **2011**, 44, 9.
30. Gomez-Ruiz, J.; Lopez-Exposito, I.; Pihlanto, A.; Ramos, M.; Recio, I. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1061.
31. Clausen, M. N. R.; Skibsted, L.H.; Stagsted, J. J.; *Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 2912.
32. Liu, Y.; Guo, R. *Int. Dairy J.* **2008**, 18, 1022.
- -Parrilla, M. C.;  
*Talanta*, **2004**, 64, 2, 501.
34. Miller, N.J.; Rice-Evans, C. A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A.; *Clin. Sci.* **1993**, 84, 407.
35. Cheryan, M.; *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Lancaster: Technomic Publishing, **1998**. 527 p.
36. Lacroix, M.; Amiot, J.; Brisson, G. J.; *J. Food Sci.* **1983**, 48, 6, 1644.
37. Carreira, R. L.; Morais, H. A.; Barbosa, C.M. S.; Motta, S.; Silvestres, M. P. C. *Braz. J. Food Technol.* **2001**, 4, 65, 103.
38. Kitts, D. D.; Weiler, K. A.; *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 1309.
39. Salami, M.; Yousefi, R.; Ehsani, M. R.; Dalgalarrrondo, J-M. C.; Haertlé, T.; Ravazi, S. H.; Saboury, A. A. *Int. Dairy J.* **2008**, 18, 1097.
40. Zhang, Q.; Ren, J.; Zhao, H.; Zhao, M.; Xu, J.; Zhao, Q. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, 46, 1014.

41. Sabeena Farvin, K. H.; Baron, C. P.; Nielsen, N. S.; Otte, J.; Jacobsen, C. *Food Chem.* **2010**, 123, 4, 1090.
42. Alli, I.; Okoniewska, M.; Gibbs, B. F.; Konishi, Y. *Int. Dairy J.* **1998**, 8, 643.
43. Hill, R. D.; Lahav, E.; Givol, D. *J. Dairy Res.* **1974**, 41, 147.
44. Saito, T.; Nakamura, T.; Kitazawa, H.; Kawai, Y.; Itoh, T.; (2000). *J. Dairy Sci.* 83, 1434.
45. Gomez-Ruiz, J. Ramos, A. M.; Recio, I. *Int. Dairy J.* **2004**, 12, 1075.

### **Lista de figuras**

Figura1: Perfil peptídico do permeado (<3000Da) de hidrolisado da caseína caprina da raça Moxotó, com grau de hidrólise de 28,5%, através da espectrometria de massa MALDI-TOF-MS\MS.

Figura 2: A. Espectro fragmentação MS/MS dos peptídeos de massa molecular 755Da; B. Espectro fragmentação MS/MS dos peptídeos de massa molecular 886Da; C. Espectro fragmentação MS/MS dos peptídeos de massa molecular 1384Da usando o programa Flex Analysis – BRUKER, Daltonics.

**Tabela 1.** Variáveis independentes codificadas de acordo com os níveis estudados para a hidrólise da Caseína caprina com o uso da papaína. Resultados dos ensaios de determinação do grau hidrólise (GH%) e atividade antioxidante expressa em TEAC (equivalentes de TROLOX) da caseína usando a enzima papaína

Ensaio	Níveis codificados		Níveis decodificados		GH%	TEAC( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de peptídeo)		
	E:S	Tempo (h)	E:S	Tempo(h)		Pool	<3000Da	>3000Da
1	-	-	1:200	3,0	17,4	882,4	349,2	418,1
2	-	+	1:200	7,0	18,9	913,2	522,73	482,9
3	+	-	1:100	3,0	3,2	1574,8	347,2	335,2
4	+	+	1:100	7,0	18,5	1883,2	865,1	1231,6
5	-1.41	0	1:220	5,0	25,0	1434,6	1002,1	634,9
6	+1.41	0	1:80	5,0	27,2	1366,8	1101,0	1407,9
7	0	-1.41	1:150	2,2	12,3	1101,3	678,9	890,5
8	0	+1.41	1:150	7,8	22,1	996,9	881,7	789,6
9	0	0	1:150	5,0	28,3	1674,2	2338,5	2030,9
10	0	0	1:150	5,0	28,5	1580,5	2329,6	1967,5

**Tabela 2.** Efeitos principais e interações do tempo e E:S (significativas estatisticamente) dos parâmetros grau de hidrólise (GH) e atividade antioxidante nos hidrolisados da caseína caprina.

	GH	TEAC(Pool)	TEAC (<3000Da)	TEAC(>3000Da)
<b>(1)E:S (L)</b>	-28,72	8,36*	26,98	13,87
<b>(2) Tempo (Q)</b>	-111,69	-8,62*	-297,48	-31,38
<b>E:S (Q)</b>	-44,41	-2,94*	-251,40	-27,06
<b>Tempo (L)</b>	76,65	1,02*	54,96	6,45*
<b>1(L) X 2(L)</b>	48,79	2,09*	27,36	9,28*

\*Não significativo.

TEAC: Atividade antioxidante em  $\mu\text{mol}$  de TROLOX/mg de peptídeo



**Tabela 3.** Massas moleculares de peptídeos identificados em hidrolisados (29% GH) da caseína caprina com papaína nas frações permeado e retentado. Os pesos moleculares em negrito foram identificados na literatura por apresentar propriedades biológicas e funcionais.

<b>Fração</b>	<b>Massa molecular dos peptídeos</b>
<b>Permeado</b>	<b>550*</b> ; 568; <b>524</b> ; 638; <b>647</b> ; <b>656</b> ; <b>672</b> ; 718; <b>727</b> ; <b>759</b> ; <b>806</b> ; <b>887</b> ; <b>970</b> ; <b>977</b> ; 1173; <b>1268</b> ; 1441; 1548; 1703; 2662; 2803; 2923;
<b>Retentado</b>	2802; 3680; 3833; 3964, 4051; 4110; 4188; 4464; 4667; 4862; 4989

\*Em negrito: Descritos na literatura por apresentar propriedades bioativas

Figura 1

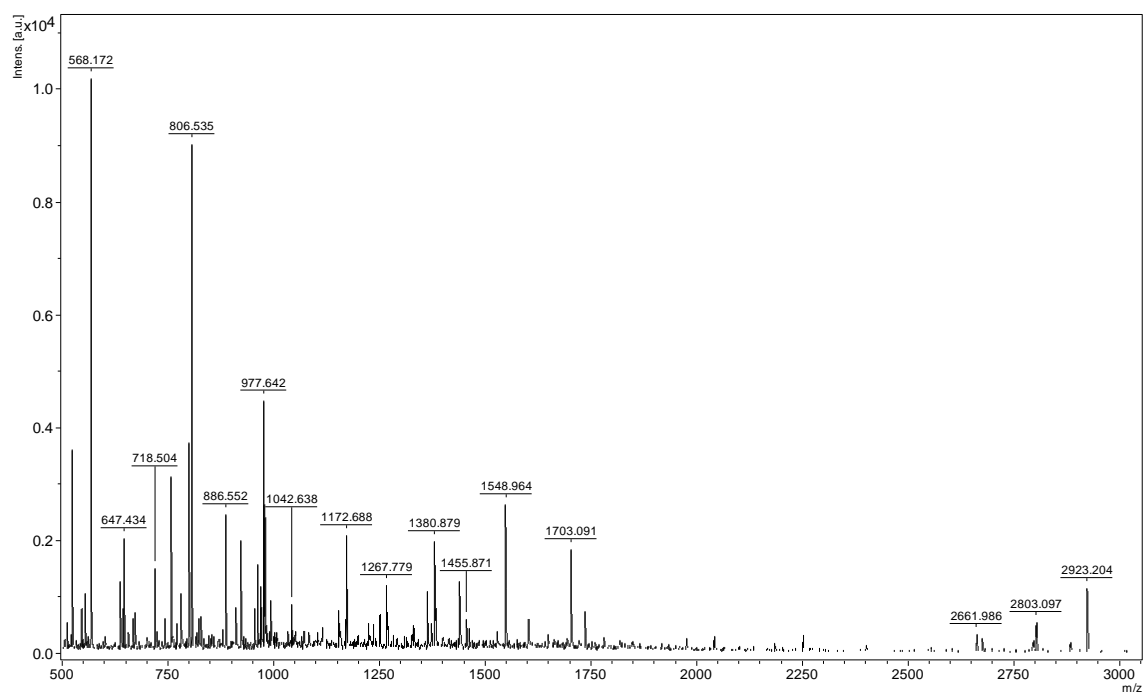


Figura 2A

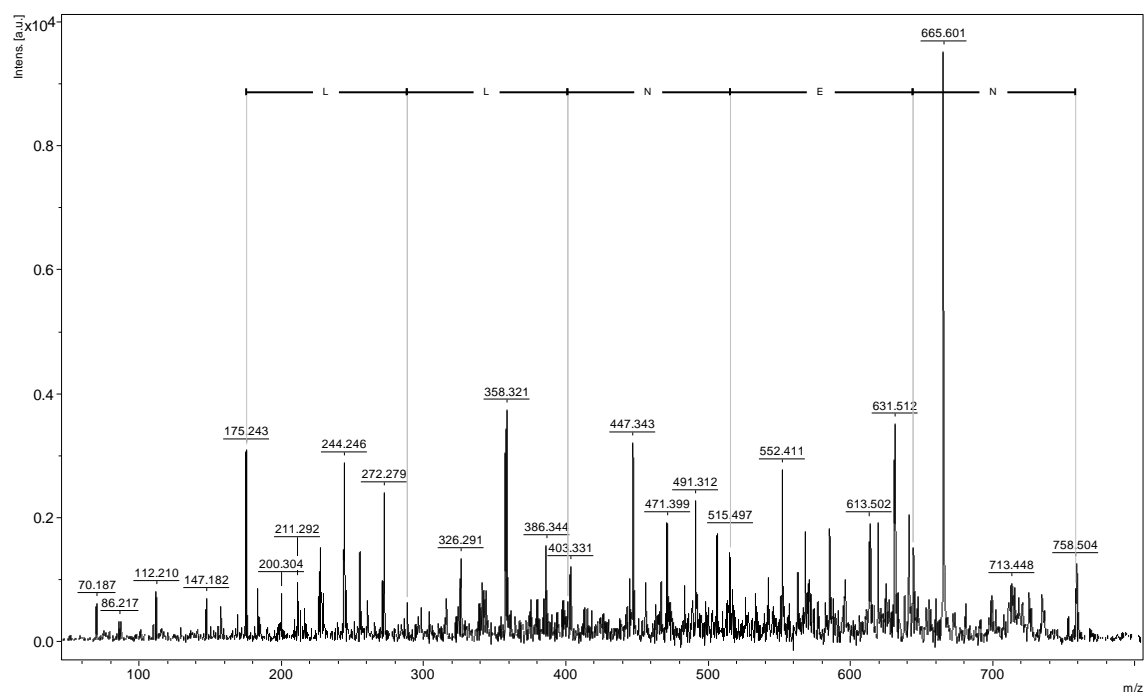


Figura 2B

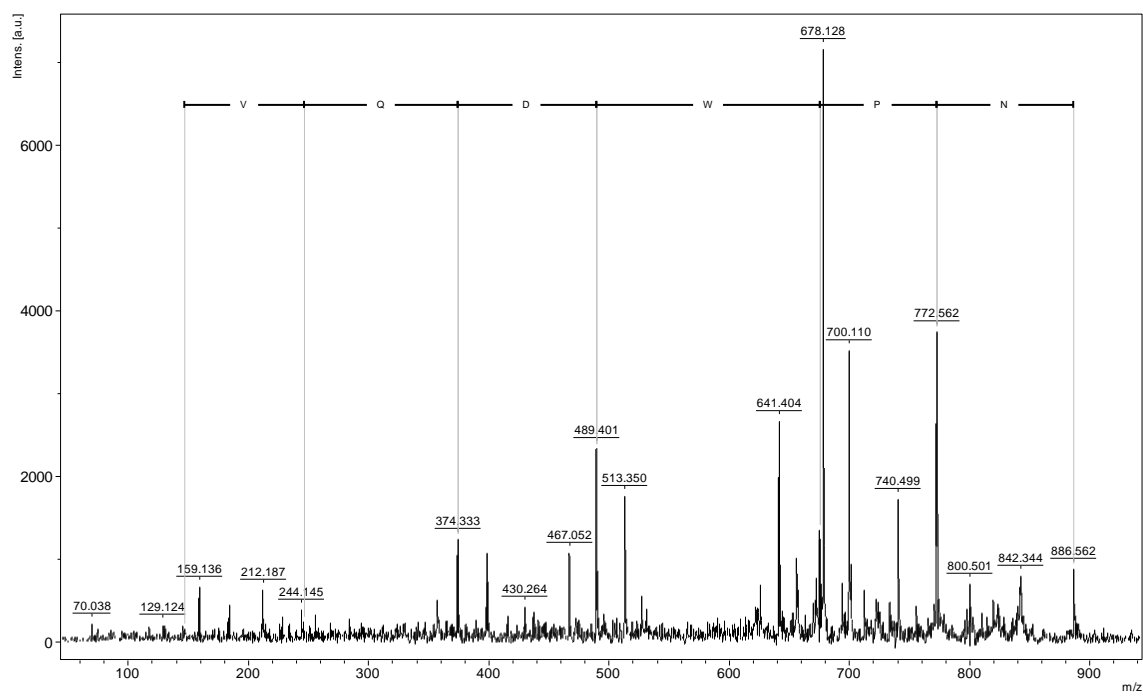
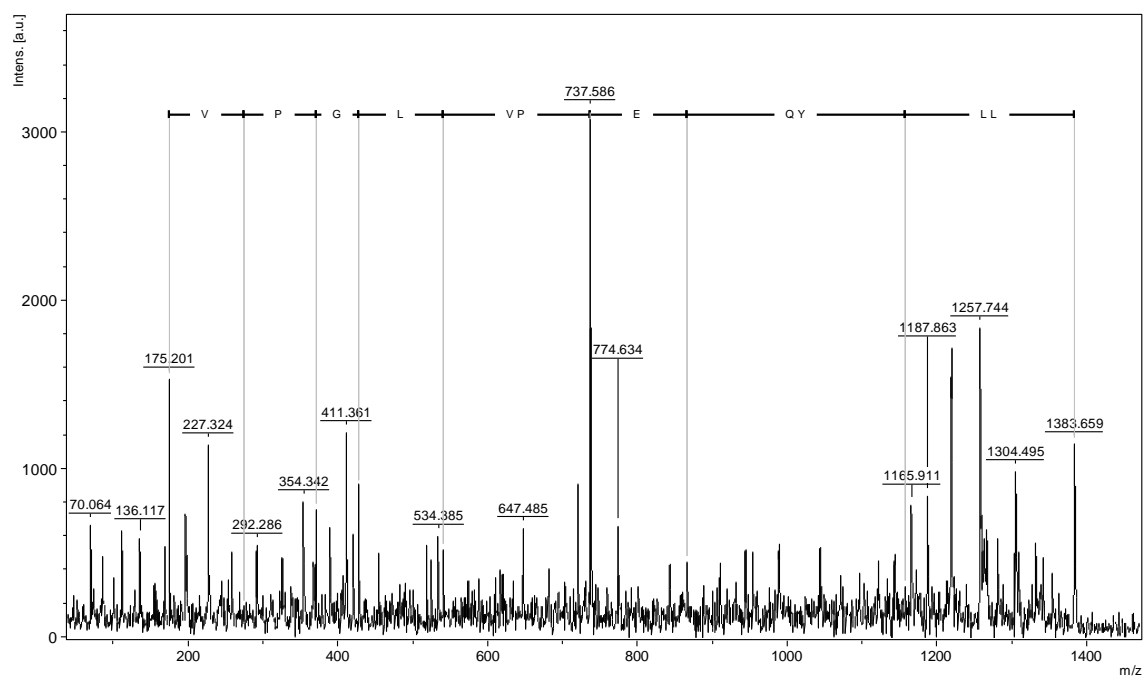


Figura 2C



**From:** jennig@assochoq.org  
**To:** villsb@yahoo.com.br, villsb@bol.com.br  
**CC:**  
**Subject:** Journal of Dairy Science JDS-12-5575 - Submission Form Needed  
**Body:** @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr. vilma bezerra:

Your manuscript entitled "Characterization and biological activities of peptides obtained from tryptic hydrolysis of Moxotó caprine casein by MALDI-TOF-MS\MS" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Dairy Science.

Your manuscript ID is JDS-12-5575.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office with questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Corresponding Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jds> .

Please complete and return the attached mandatory copyright release form to the editorial office (FAX: 217-378-4083). If authors are at more than one institution, separate forms may be filed by each author. All author signatures are required.

Failure to return the form will delay the publication process if your paper is accepted for publication.

Sincerely,  
Journal of Dairy Science Editorial Office

**Date Sent:** 27-Mar-2012

**File 1:** [\\* JDS-Copyright-2010.pdf](#)

**CAPÍTULO 5**

---

Characterization and biological activities of peptides obtained from tryptic hydrolysis of Moxotó caprine casein by MALDI-TOF-MS/MS

Artigo submetido ao Journal of Dairy Science

Fator de Impacto: 2,486 JCR 2008

Peptides from tryptic hydrolysis of caprine casein

Characterization and biological activities of peptides obtained from tryptic hydrolysis of Moxotó caprine casein by MALDI-TOF-MS/MS

**Vilma Sobral Bezerra<sup>(\*, §)</sup>, Tatiana Barros Ferreira Lira<sup>(\*)</sup>, Roberto Afonso da Silva<sup>(\*, §)</sup>, Julia Furtado Campos<sup>(†)</sup>, Camila Souza Porto<sup>(\*, §)</sup>, Tatiana Souza Porto<sup>(‡)</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>(§)</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>(\*, 1, §)</sup>**

\* LABTECBIO/DMFA (Laboratório De Tecnologia de Produtos Biotivos) Federal Rural University of Pernambuco, Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

† CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), Prof. Luiz Freire Avenue, 01, Cidade Universitária, CEP 50740-540 Recife, PE, Brazil

‡ Federal Rural University of Pernambuco, Academic Unit of Garanhuns, Do Bom Pastor Avenue, s/n, CEP 55292-270 Garanhuns, PE, Brazil

§ Federal University of Pernambuco, Lab. of Immunopathology Keizo Asami, Prof. Moraes Rêgo Avenue, s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE Brazil



<sup>1</sup>Corresponding author: villsb@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Casein bioactive peptides, produced by enzymatic hydrolysis, are beneficial to health when incorporated into functional and nutraceuticals foods. This study aims to determine peptides amino acid sequence obtained from casein caprine tryptic hydrolysis. A 2<sup>2</sup>-factorial design was used to evaluate the effect of two independent variables, pH and E:S (ratio of enzyme to substrate), on degree of hydrolysis and antioxidant activity of casein by using trypsin. Hydrolysates were submitted to ultrafiltration. Permeate and retentate fractions were used for biological activities tests. The highest degree of hydrolysis (28.9%) was obtained at pH 8.0 with an E:S of 1:200. Antioxidant activity varied from 1605.8 to 3245.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{TROLOX}\cdot\text{mg}^{-1}$  of peptide and zinc-carrier capabilities reached 82% with a half-maximal inhibitory concentration of 4.46  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Permeate peptides (<3000 Da) displayed antimicrobial activity against various microorganisms, mainly *Bacillus subtilis* ATCC 6633, which showed a MIC of 0.98  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Goat casein permeate (<3000 Da) peptide profile, which had a degree of hydrolysis of 28.9%, obtained at pH 8.0 with an E:S of 1:200, demonstrated peptides with 833 and 2230 Da. These peptides referred respectively to HPINHQGLSPEVPNENLLR and LLYQEPVLGPV amino acids sequences, which correspond to  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins fragments. Both amino acids sequences are needed in order to produce bioactives with potential use in industrial applications.

**Key Words:** bioactive peptides, tryptic hydrolysates, goat casein

## 1. INTRODUCTION

Caprine and ovine milk are important proteins sources and have nutritional properties, which can improve health and prevent the onset of diseases (Gomez-Ruiz et al 2008). The most important milk protein is casein, which constitutes about 80% of total milk proteins, and shows 4 main types of casein:  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein (Silva et al 2009). These proteins are the main source of biologically active peptides in the diet and many of their properties are obtained only after hydrolysis (Adamson and Reynolds, 1997; Fitzgerald and Murray, 2006).

The hydrolysis of milk proteins occurs, *in vivo*, due to gastrointestinal enzymes action during digestion or, *in vitro*, during food processing by proteolytic enzymes (Frenhani and Burini, 1999; Srinivas and Prakash, 2010). Tryptic hydrolyzed casein may have numerous biological activities, among which we highlighted the ability to increase minerals absorption, as well as antioxidant and antimicrobial activities. These physiological and biological casein activities can be attributed to several peptides, especially those with low-molecular weight, mainly di-tripeptides and oligopeptides (Hernandez-Ledesma et al., 2005; Contreras et al., 2009).

An important dairy proteins property is their possible application in food additives. The use of casein peptides in preventing oxidation reactions and food deterioration has been widely investigated (Jiang et al., 2007; Gomez-Ruiz et al., 2008). Several studies have shown that casein hydrolysates may have higher antioxidant patterns than substances such as vitamins C, E and carotenoids (Miller et al., 1993; Villaño, et al., 2004). Antioxidant properties depend on chemical structure of the peptide produced during proteolysis, especially protein fragment ability to donate electrons or

hydrogen atoms and to relocate unpaired electrons in aromatic structures (Villaño, et al., 2004; Farvin et al., 2010; Contreras et al., 2011).

Casein phosphorylation interferes with its biological activities, however, this can be regulated by binding protein or hydrolyzed protein to a metal ion (calcium, iron or zinc). These metals are essential to living organisms, since they catalyze many interactions in biological systems (Hunter, 2000).

One of the most acceptable mechanisms for zinc absorption by hydrolyzed casein involves amino acids and peptides containing cysteine releases, which can form soluble complexes with this element (Gibson et al., 2001). Thus, casein nutritional properties with respect to its mineral binding ability are well documented (Gibson, 2001; Ming and Epperson, 2002; Dashper et al., 2005). Nevertheless, the existence of this property in Moxotó goat-casein tryptic hydrolysates is yet to be investigated.

One casein well-documented functional property is its activity as an antimicrobial agent (Lopez-Exposito et al., 2006; Birkemo et al., 2008; Haque, Chand, 2008).

Biological properties of  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\kappa$ -casein, and  $\alpha_{s2}$ -casein (bovine) fractions were investigated in a large quantity of studies; however, little has been demonstrated with casein peptides from other animal species such as goats.

Biologically active peptides produced from bovine casein by enzymatic hydrolysis have the potential to be used in food industry, as ingredients and additives, as well as in pharmaceutical and in cosmetics industry (Marshall, 2004). Nevertheless, bioactive peptides production by goat or sheep milk casein hydrolysis, both of which have high genetic variability, and therefore, may give rise to different bioactive peptides, has not been explored extensively (Corrêa et al., 2011).

Functional foods consumption was increased each year, but researches regarding exact structure of peptides utilized are still lacking (Shah, 2000). This is important for

accurate determination of biomolecules responsible for bioactivity, and subsequent exploitation of these substances in food and pharmaceutical industries.

Biologically active casein peptides can be separated and evaluated by various methods. The main techniques used include uni or bi-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel, ultrafiltration and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (Cuollo et al., 2010; Srinivas and Prakash, 2010; Contreras et al., 2011).

This study aims to determine antioxidant, antimicrobial and zinc carrier properties of casein tryptic hydrolysates in Moxotó goat milk, as well obtaining peptide and amino acid sequence profile of bioactive properties hydrolyzed using MALDI TOF MS.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Materials**

All solvents and reagents used were of analytical grade. Moxotó breed goat milk was collected in sanitary manner, in accordance with Brazil (2002). The animal used in milk extraction was from Sertânia city, state of Pernambuco, Brazil. Milk samples were maintained in liquid nitrogen and were frozen immediately after collection.

### **2.2 Casein extraction**

Casein extraction was performed by isoelectric precipitation at pH 4.6, according to Egito et al. (2006), with the elimination of toluene step. Precipitated casein was dissolved in 1.0M NaOH, pH 7.0, and subjected to dialysis in deionized water at 4 °C for 96 h. Products were frozen dried and stored at -20°C.

### **2.3 Experimental Design**

The effects of pH and E:S variables on the degree of hydrolysis (DH) and antioxidant activity were determined according to a complete factorial design ( $2^2$ ), as recommended by Bruns et al. (2006). Therein, 4 trials were performed corresponding to combinations between levels of variables, with 4 replications at the central point. Table 1 shows parameters studied and their levels [temperature and reaction time were set, respectively, at 40 °C and 5 h] (Lira et al. 2010).

### **2.4 Casein Hydrolysis**

Hydrolysis time, pH and the ratio of enzyme concentration to substrate concentration (E:S) were selected as the two independent variables, whereas the measured responses variable were degree of hydrolysis (DH) and antioxidant activity. Solutions containing 2% (w/v) casein in sodium phosphate buffer were subjected to hydrolysis at 37°C. After hydrolysis, samples were subjected to a shaking step for 30 s and were incubated in a 90°C water bath (15 min) for enzyme inactivation. Afterwards, samples were centrifuged at 12,000 × *g* and supernatants were used to determine the DH.

### **2.5 Degree of Hydrolysis**

The determination of casein DH using trypsin was performed according the methods described by Centenaro et al. (2009). After hydrolysis, samples were agitated for 30 s and denatured by heating at 90 °C for 15 min. After enzyme inactivation, samples were centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min. The pool of peptides was used for the determination of soluble protein content and others biological activity assays, and

non-hydrolyzed casein was used for the determination of total protein content. The DH was expressed according to relationship between soluble proteins amounts, determined by Lowry et al. (1951) method, and total protein present in the substrate, as determined by Kjeldahl method as recommended by AOAC (2000).

## **2.6 Ultrafiltration**

The casein tryptic hydrolysates (pool of peptides) were submitted to ultrafiltration, using an Amicon membrane with a 3000-Da cut off value, and centrifuged for 40 min at  $12,000 \times g$ ; 2 protein fractions, which were denominated as retentate and permeate, were obtained. The pool of peptides, peptides contained in retentate ( $>3000$  Da) and peptides contained in permeate ( $<3000$  Da), were used to test antioxidant and antimicrobial activities.

## **2.7 ABTS Radical-antioxidant Activity**

The antioxidant activity was determined using ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation as described by Re et al. (1999). ABTS was dissolved in ethanol to 1.0 M, and the ABTS radical cation was produced by allowing the 1.0 M stock solution and 2.45 mM potassium persulfate to react, followed by a standing period in dark at room temperature for 16 h before use. The stock solution was used for a maximum of 3 days. Immediately prior to use, ABTS solution was diluted with ethanol to an absorbance of  $0.70 \pm 0.02$  at 734 nm. TROLOX acid (6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametichromano-2-carboxylic acid) (0–2.0 M) was used as standard. Six minutes after the addition of 30  $\mu$ L of sample (containing 0.05–0.8 mg of tryptic hydrolysates) or 3.0 mL of standards diluted in ABTS solution, the absorbance was measured at 734 nm using an absorbance spectrophotometer

(Micronal model B582; São Paulo-BR). An ethanol blank sample was ran in each assay. All determinations were carried out at least 3 times. The percentage inhibition was calculated and plotted as a function of antioxidant concentration and TROLOX for standard reference data.

## 2.8 Zinc-binding Activity

Pools of hydrolyzed caprine casein were used for zinc-binding activity determination. Zinc chloride solutions ( $\text{ZnCl}_2$ ) at concentrations between  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , prepared in sodium phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH 7.0), were added to hydrolyzed protein and incubated for 60 min in a  $36^\circ\text{C}$  water bath, according to the method proposed by Dashper et al. (2005).

The 200-mg sample was calcined in a muffle furnace ( $500^\circ\text{C}$ ) for 3 h, until a constant weight was obtained. The white ash was used to quantify zinc concentration in the samples by using optical emission spectrometer-inductively coupled plasma (ICP-OES) at an absorbance of 213.9 nm (AOAC, 2000). Zinc-binding activity was expressed in 2 ways: as a percentage of inhibition and as an inhibitory concentration, expressed as  $\text{IC}_{50}$ , which was defined as the concentration of hydrolyzed peptide ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) required to reduce the concentration of zinc carried by 50%.

## 2.9 Antimicrobial Activity

The following microorganisms were used as standards to determine antimicrobial activity of caprine casein tryptic hydrolysates by using peptides samples contained in the permeate ( $<3000 \text{ Da}$ ) and retentate ( $>3000 \text{ Da}$ ): *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas*

*aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Minimum inhibitory concentration (MIC) tests were performed in a 96-well polystyrene plate (ELISA; Nunc. Inc. Denmark).

MIC was determined using a micro-dilution assay plate, according to the protocol of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000). Hydrolysates were sterilized with a 0.22- $\mu\text{m}$  cell filter and used at final concentrations between 62.5 and 0.24  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for micro-dilution assay. The assay included negative, positive and blank controls. The plate was aerobically incubated at 37 °C in a bacteriological chamber (model NT 523; Nova Técnica, Sao Paulo, BR) for 24 h. The minimum inhibitory concentration was the lowest concentration of hydrolyzed protein in which microbial growth was not observed. It was identified by the addition of 25 $\mu\text{L}$  developer Resazurin, which is a sodium salt powder from Acros Organic NV, prepared at 0.02% (wt/vol) in distilled water, sterilized by filtration and stored at 4°C for up to 1 week.

## **2.10 Peptide Profile by Mass Spectrometry and Amino Acid Sequencing**

The peptide profile was obtained by MALDI-TOF-MS using a Bruker AuTOFlex III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), equipped with an Nd-YAG Laser (355 nm). Samples and matrix solutions (10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile with 0.3% trifluoroacetic acid) were mixed and spotted onto a MALDI target plate (MTP 384 Ground Steel, Bruker Daltonics), and left to dry at room temperature. Spectra were recorded in the positive reflection mode with an acceleration voltage of 19 kV, in the mass range of  $m/z$  500–4480. The selected parent ions were fragmented using LIFT mode. External calibration was



performed using a standard mixture of peptides (Bruker Daltonics-USA). Data were acquired using Flex Control 3.0 software and spectra were processed using Flex Analysis 3.0 software (both from Bruker Daltonics). The obtained amino acid sequences were compared with protein database sequences by NCBI BLAST tool.

### **2.11 Statistical Analyses**

The results were analyzed by ANOVA ( $P < 0.05$ ) using Statistica 8.0 software. Tukey test ( $P < 0.05$ ) was used for means multiple comparisons.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Degree of Hydrolysis (DH)**

Table 1 shows that the highest DH was 28.9%, obtained in test 7, pH 8.0 and an E:S of 1:200. These results differ from those obtained by Adamson and Reynolds (1997) and Qi et al. (2003), in which DH values were 5% and 21% when E:S values were 1:200 in ethanol presence and 1:50 in ethanol absence, respectively. Those authors achieved DH and E:S results when bovine casein was treated with trypsin in ethanol presence or absence. According to Frenhani and Burini (1999), for protein hydrolysates to be functional and to have good nutritional quality, the hydrolysis process must be efficient, leading to the formation of oligopeptides containing 2–6 amino acid residues. Further hydrolysis could impair the biological activity of resulting products. Table 2 shows the independent variables (pH, E:S) effects on DH and antioxidant activity. All variables had a negative effect on the DH of trypsin-treated caprine casein; for example, the lowest E: S (1:200) as well as the lowest pH (8.0) values favored a high DH value. These results were similar to those obtained by Qi et

al. (2003), who used a pH 8.0 to hydrolyze casein with trypsin. Furthermore, these findings corroborate the results obtained by Lira et al. (2010), who showed that a decrease in the pH from 8.5 to 8.0 and a reduction of the E: S value from 1:150 to 1:200 would positively favor the DH value. Interestingly, we observed a positive effect when the interaction between variables 1 (pH) and 2 (E: S) was assessed. Thus, it is important that the parameters values of pH and E: S decrease simultaneously in order to allow an increase in the DH value.

### **3.2. Antioxidant Activity**

Antioxidant activity were performed in the tryptic hydrolysates, obtained by ultrafiltration, which consisted of permeate (peptides <3000 Da) and retentate (peptides >3000 Da). All tested samples presented antioxidant activities (table 1) antioxidant activity for . Caprine casein tryptic hydrolysates contain peptides and amino acids which are able to act as electron donors when reacting with free radicals, converting them into more stable products. Our result corroborates that one obtained by Silva et al. (2006), who demonstrated that caprine cheese, proteolytic degraded by proteases extracted from *Cynara cardunculus*, has powerful antioxidant properties.

The influence of pH and E: S variables values on the antioxidant activity was reported in table 2. Among the largest pool of peptides, TEAC activity was obtained at pH 8.0 and at an E: S of 1:200, however, only the pH parameter had a significant effect. It has been demonstrated that the antioxidant activity increases when the pH value decreases. Our result indicated that pH plays a major role in enzymatic reaction, therefore, it value must remain within a narrow range. Thus, it is important to know the pH range in which enzyme is more stable, since ideal pH for maximum

stability does not always coincide with that required for its maximum activity (Nalinanon et al., 2011).

In our analysis, antioxidant activity (TEAC) was correlated with DH in the pool of peptides. Morato et al. (2000) showed that DH values as well as decreased levels of free amino acids and large peptides are important parameters in procuring medium- and short-chain peptides (di-tripeptides), which possess the biological properties required for protein hydrolysates. In permeate (<3000 Da), pH and E: S variables values had no significant effects on antioxidant activity. However, antioxidant activity analysis of retentate peptides (>3000 Da) showed that pH and E: S values as well as the interaction between them influenced biological response (Table 2). Specifically, it was found that at lower pH and E: S values, antioxidant activity increases, however, this increased activity requires both pH and E: S values to decrease simultaneously. We evaluated the correlation between antioxidant activity and the DH values. Our results demonstrated an increased DH value correlation with increased antioxidant activity up to a DH value of 23.7%; above this value, minimal changes in antioxidant activity were observed. High DH values allow enlargements in bioactive peptide production; however, extensive hydrolysis can be harmful, because free amino acids have limitations with respect to stability and solubility (Morato et al., 2000). This may explain the high antioxidant activity obtained with a DH value of 23.7%. In relation to antioxidant activity determination, our result demonstrated, in peptide pool, that the activity in Trolox equivalents increased at the central point and was statistically higher than those at other points (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). In the peptides of permeate (<3000 Da), the highest activities were obtained in experiments 1 and 3 (statistically equal). The central points (5, 6, 7, and 8) were higher in the pool of peptides than in the permeate (<3000 Da) or retentate (>3000 Da). The run 1

obtained at pH 7.5 and E:S value of 1:250 demonstrated that peptide separation did not favor antioxidant activity, because peptides with higher antioxidant activity were produced in the retentate (>3000 Da) compared to the permeate (<3000 Da). Counter to this, Gomez-Ruiz et al. (2008) and Jiang et al. (2007) found that ultrafiltration maximized the antioxidant properties of casein hydrolysis products. This is possibly due to spacial interactions between the peptides present in the fraction (>3000 Da), which allows greater biological activity. Different conditions are necessary to increase DH values from goat casein as well as to increase antioxidant activities production. Therefore, high biological activities can be observed under conditions of low DH values, indicating that DH is not the only factor that determines biological activity (Guo et al. 2009).

Assembled, these results indicate that, although ultrafiltration is considered a method for protein hydrolysates enrichment (Jiang et al., 2007), it is not always the best option for biologically active peptides. Indeed, depending on the conditions employed, especially preparation of protein hydrolysates, the absence of ultrafiltration may facilitate bioactive properties of casein hydrolysates, which would be cost effective, especially in large-scale production.

The TEAC antioxidant power in tested samples ranged from 1605 to 3245  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of Trolox equivalent $\cdot\text{mg}^{-1}$  of peptides hydrolysates; the greatest antioxidant potential was noted in peptides of retentate. These results reflect the importance of hydrolytic conditions for obtaining caprine casein hydrolysates with biological activity. The results of Gomez-Ruiz et al. (2008) were similar to ours, demonstrating antioxidant activity by the ABTS method up to 1760  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of Trolox equivalent $\cdot\text{mg}^{-1}$  of protein hydrolysates for samples of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein bovine and ovine treated with trypsin (pH, 8.0; E:S, 1:200; reaction time, 4 h; temperature, 37 °C).

A comparison between TEAC values of these (run 6) peptides with previous results obtained using the same method indicates that caprine casein hydrolysates antioxidant capacity is comparable to that of some wines (Villano, 2004), and possesses activity patterns similar to that of the antioxidant BHA (3-tert-butyl-4-hydroxyanisole), which has a TEAC of  $2430.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of Trolox equivalent $\cdot\text{mg}^{-1}$  of protein hydrolysates (Contreras et al., 2011). In addition, results for caprine casein tryptic hydrolysates were better than those for  $\alpha$ -tocopherol and vitamin C, which showed a TEAC value of 970.0 and 990.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of TROLOX, respectively (Miller et al., 1993).

The antioxidant activity of hydrolyzed casein in caprine milk can be attributed to the presence of amino acid-rich peptides such as histidine, lysine, proline, and tyrosine, as well as factors such as protein conformation beyond the primary configuration. Moreover, casein has high proline content in the primary sequence, which contributes to opened structure of the peptide (Kitts & Weiler, 2003).

### ***3.3. Zinc-binding Activity***

Peptides pool present in samples from run 1 (pH, 7.5; E:S, 1:250), 2 (pH, 8.5; E:S, 1:250) and 6 (pH, 8.0; E:S, 1:200) were randomly chosen to determine zinc-carrier activity (Table 1). These hydrolysate samples from tryptic hydrolyzed casein treated with  $\text{Zn}^{2+}$  demonstrated different zinc-binding abilities, whose best  $\text{IC}_{50}$  of  $4.46 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  was obtained with peptides in test 6. Zinc-carrier activity increased with DH value, suggesting that it plays a role in biological activity. The zinc-binding effects obtained in this study were similar, in relation to magnitude order, to those obtained by Srinivas & Prakash (2010); they observed an  $\text{IC}_{50}$  of  $2.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  for bovine casein

hydrolysates treated with chymotrypsin. Ming & Epperson (2002) obtained an  $IC_{50}$  of  $45 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  with the standard zinc-carrying drug bacitracin. This result is about 10 times greater than that obtained with goat casein tryptic hydrolysates. However, it was observed that samples treated with  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  zinc showed a zinc-carrying value of 81.76%. This result is far greater than that achieved with the tryptic hydrolysates of casein treated with  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  zinc, which showed a carrying value of only 9.35%. This is probably due to the fact that, even at low concentrations ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  zinc), zinc already occupies almost all peptide interaction available sites, and the subsequent increase in this metal concentration leads to saturation, with no further available binding site. This property was demonstrated by Harzer & Kauer (1982), who determined casein zinc-binding capacity of  $8.4 \mu\text{g Zn}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein; however, they found that casein enzymatic hydrolysis maximizes the carrier potential.

### **3.4. Antimicrobial Activity**

Table 3 shows the results for antimicrobial activity of peptides present in permeate (<3000 Da) fractions obtained by sample ultrafiltration from run 6 (pH, 8.0; E:S, 1:200; DH, 28.6%). These peptides had MICs of  $0.98 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $1.95 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Escherichia coli* ATCC 25922, respectively. The peptides present in retentate demonstrated an MIC of  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  against *En. faecalis* ATCC 6057, *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 29665.

No scientific reports in relation to antimicrobial activity of the peptides from trypsin-hydrolyzed Moxotó caprine casein was described in the literature; therefore, our results were compared with casein hydrolysates of other species. The results of our study corroborate Lopez-Expósito et al. (2006), who had observed antimicrobial activity in casein peptides from bovine milk against *E. coli*, *Serratia marcescens*,

*Staphylococcus carnosus*, and *Staphylococcus epidermidis*, with a MIC  $<4.79$  mg·mL<sup>-1</sup> in *E. coli*. Additionally, permeate peptides ( $<3000$  Da) obtained results differ from those obtained by Malkoski et al. (2001), who demonstrated a MIC of 4.30 mg·mL<sup>-1</sup> in *E. coli* using peptides from bovine casein treated with chymosin. In the other hand, retentate ( $>3000$  Da) peptides were less potent. In addition, it was observed that both retentate and permeate peptides demonstrated higher MICs than those obtained by Forssmann et al. (2003), McCann et al. (2005) and Birkemo et al. (2008). MIC reported values were between 0.001 and 0.313 mg·mL<sup>-1</sup> against *B. subtilis* (Forssmann et al., 2003; McCann et al., 2005) and 0.076 mg·mL<sup>-1</sup> for *E. coli* (McCann et al, 2005), when bovine casein peptides were used. An average MIC of 0.450 mg·mL<sup>-1</sup> for *E. coli* was obtained using casecidin extracted from fresh colostrum (Birkemo et al., 2008).

Hancock and Lehrer (1998) demonstrated that the difference in susceptibility to *E. coli* can be attributed to structural and functional complexities of gram-negative bacteria cell envelope. Moreover, gram-negative bacteria cytoplasm and outer membrane consist of lipopolysaccharides, phospholipids, lipoproteins as well as proteins, and they are involved in the resistance to antibacterial peptides. This may explain the greater efficiency of the permeate peptides from caprine casein hydrolyzed with trypsin against *B. subtilis* in comparison to *E. coli*.

The peptides present in retentate from caprine casein hydrolyzed with trypsin showed a MIC of 20 mg·mL<sup>-1</sup> for *En. faecalis* ATCC 6057, *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 29665. These results corroborate those obtained by Malin (2001), who showed similar activities of peptides with masses less than 4.5 kDa against gram-positive and gram-negative bacteria; although tested hydrolysates have higher MICs than most studies (McCann et al., 2005). One explanation for

antimicrobial activity of the peptides tested in the peptides of permeate (<3000 Da) and retentate (>3000 Da) fractions is the disruption of membrane permeability (Fitzgerald & Murray, 2006). Moreover, Malkoski (2001) states that some antibacterial casein peptides have a higher percentage of basic residues, which facilitate the interaction between positively charged peptide and negatively charged bacterial membrane.

Therefore, cationic peptides may have similar characteristics, since the positive charge is important for antimicrobial activity. The peptides obtained from Moxotó caprine casein tryptic hydrolysates have a potential application in infant food formulas, as antibacterial peptide supplements, especially those absent in human milk, which can influence the composition of intestinal micro flora (Malkoski, 2001).

### ***3.5. Peptide Profile of Tryptic Hydrolysates of Caprine Casein***

Caprine casein hydrolysates peptide profile was obtained from the permeate (<3000 Da) sample 7, which had a DH value of 28.86%, high antioxidant activity, antimicrobial activity and zinc-carrier capability. Trypsin is an endopeptidase (serine protease) which has an affinity for breaking peptidic bonds involving basic amino acids. However, this break depends on cleavage kinetics of reaction conditions. Under some mild, nonspecific cleavages can lead to protein degradation in other amino acids, inducing production of several different peptides, which can benefit bioactive production (Kim et al, 2007). Therefore, we observed that several peptides, obtained during degradation, showed a unique specificity for trypsin, while others breaks were non-specific, as can be seen in the N-terminal and C-terminal peptides identified. Peptide profiles were compared to molecular weights described in the literature for caprine casein peptides or other species (figure 1). Fifty-nine peaks



were detected following the release of peptides by caprine casein tryptic hydrolysis ; of these, 22 peptides revealed to possess biological activity (Hill et al., 1974; Otte et al., 2007; Su et al. 2007).

Among identified peptides, those possessing molecular weight of 838.38, 977.51, and 1071.53 Da presumably have antioxidant activity (Suetzuna, 2000; Gomez-Ruiz et al., 2008) and peptides with molar masses of 977.51, 1957.88, and 2252.85 Da showed the capacity to carry minerals (Su et al., 2007; Ruiz-Gomez et al., 2008). Peptides with molecular weights of 2043.90, 2252.85, and 2163.90 Da possibly have antimicrobial properties (Benkerroum, 2010). Lopez-Exposito et al. (2006) identified 4 cationic antimicrobial peptides from sheep  $\alpha$ 2-casein hydrolyzed with porcine pepsin (reaction time, 30 min; temperature, 37 °C; E:S, 3.7:100). Apart from these peptides, a 1717.94-Da peptide has been identified in literature as possessing multifunctional properties, including both anti-hypertensive and antioxidant properties, zinc-carrier capabilities and antimicrobial activity (Srinivas & Prakash, 2010).

Figure 2A and 2B show the spectra of MS/MS, obtained after fragmentation of the charged ions. Fragmentation spectra were obtained for selected precursor ions of peptides with molecular mass of 1383.60 and 2163.90 Da (as shown in the example). Unfortunately, the fragmentation of precursor ions corresponding to some peptides demonstrated low intensity and, therefore, provided insufficient information in order to enable the identification of all peptides present in the profile when analyzed with the MS/MS (figure 2). The peptides with higher m/z values were used to determine amino acid sequences. Generally, the ion charge (z) was +1 and, therefore, m/z can be compared to peptides molecular weight . Furthermore, distance between some peptides was small, thus preventing high resolution for

amino acids detection during fragmentation. Therefore, 5 peaks were chosen as examples for peptide sequencing.

Peaks fragmentation for 1881.00, 1383.60 and 977.48 Da refer to  $\beta$ -casein sequences f(191–203), f(191–201) and f(194–202), which correspond to the amino acid sequences LLYQEPVLGPVRGPFPI, LLYQEPVLGPV, and QEPVLGPVR; the 1383.6-Da peptide is shown as an example (figure 2A). Peptides determined in this study were similar to those obtained by Contreras et al. (2009) and Alli et al. (1998) with a fragment of  $\beta$ -casein. The 1700.9-Da peptide corresponds to f(98–104) of  $\beta$ -casein, with the sequence VVPPFLQ. Despite complete identification impossibility of this peptide sequence, this fragment shows features associated with antioxidant properties, such as high valine and proline content in the primary structure.

The fragmentation of the 2163.90Da peptide (Figure 2B) showed the sequence of amino acids HPINHQGLSPEVPNENLLR which corresponds to f(4–22) of caprine  $\alpha$ s1-casein. Lahov et al. (1971) and Hill et al. (1974) also reported that 2163.9-Da peptide refers to a fragment of  $\alpha$ s1-casein, which possesses both antimicrobial and anti-hypersensitivity properties and is an immunomodulatory.

Cuollo, (2010) demonstrated the fraction f (1-23) of  $\alpha$ s1-casein, allowed the distinction between various types of casein, such as buffalo, cattle and goats (genetic variants A and B), which were identified in samples of hydrolyzed tryptic by MALDI-TOF. This peptide, f (1-23) of  $\alpha$ s1-casein, is used to identify the origin of various casein species. In the literature, it was described as isracidin, when casein has bovine origin. Caprine  $\alpha$ s1-casein gene locus contains varied and complexes polymorphisms which may be associated with quantitative variations in protein and fat composition. This caprine milk peculiar aspect favors genetic selection to improve

the physico-chemical, nutritional and technological properties of caprine milk (Silva et al., 2007).

Caprine casein hydrolysates are identifiable through the presence of some diagnostic amino acid residues in the f(4–22) of caprine  $\alpha$ 1-casein. Specifically, a Pro<sup>16</sup> residue is present in the caprine variant that replaces the Leu<sup>16</sup> residue observed in the bovine  $\alpha$ 1-casein. Moreover, the presence of a Pro<sup>13</sup> residue in caprine  $\alpha$ 1-casein contrasts the Gln<sup>13</sup> residue in bovine  $\alpha$ 1-casein (Cuollo et al, 2010). Therefore, the casein used in this studied was obtained from the caprine casein variant gene B.

Genetic studies conducted by Silva et al. (2009) using PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) on  $\alpha$ 1-casein obtained from goats milk in Pernambuco, Brazil, showed that Moxotó caprine casein genetic features are consistent with the genetic variant type B. We, conclude that the peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Moxotó caprine casein are useful tools for exploring bioactive peptides and can be used as diagnostic tools when performing quality control of dairy products.

The 1307.80Da peptide sequence corresponds to fragment f(38–48) of-casein  $\alpha$ 1 and amino acid sequence FVVAPFPEVFR. Rizzello et al. (2005) obtained a peptide fraction, which consisted of bovine  $\alpha$ 1-casein f(38–48) and displayed antimicrobial properties against several *E. coli* and *En. sakazakii* strains. The 1307.8-Da peptide sequence corresponds to casein  $\alpha$ 1 fragment f(38–48) and the amino acid sequence FVVAPFPEVFR. These peptides possess antioxidant and antimicrobial properties against gram-positive and gram-negative bacteria, as well as they may have similar sequences to  $\alpha$ - and  $\beta$ - casein peptides.

Thus, caprine casein tryptic hydrolysates antioxidant activity may result from amino acid residues presence, such as Val or Leu at the N-terminal and Pro, His, or Tyr in

the amino acid sequence of the peptide (Chen et al., 1995). This corroborates Hernandez-Ledesma et al. (2005) findings, who identified 8 peptides from fermented milk antioxidants, of which 7 were identified as containing at least 1 Pro residue, and 6 had more than 2 Pro residues.

Moreover,  $\beta$ -casein constitutes the largest sub-fraction of casein proteins and it is composed of 16% Pro, which contributes to these hydrolysates antioxidant power. Farvin et al. (2010) demonstrated, using MALDI-TOF-MS, that bovine milk yogurt casein antioxidant activity can also be obtained from fragments of  $\beta$ -casein hydrolysates in the regions f(191–208) and f(191–207). Interestingly, these are the same regions of  $\beta$ -casein that were sequenced in the hydrolysates of goat casein in the present study (Figure 2B).

The zinc-binding activity of caprine casein tryptic hydrolysates was not confirmed by fragmentation spectra obtained through Flex Analysis. However, it can be stated that zinc carrying occurs through the interaction between zinc and casein/casein peptides via the presence of phosphorylated serine residues. The high casein molecules affinity to di- and trivalent cations is attributed to its phosphorylation. The casein phosphorylation extent is dependent on casein type in question (Wang, et al., 2007). In this study, we identified and sequenced bioactive peptides by using caprine casein hydrolysates, obtained by trypsin digestion, and established an appropriate experimental conditions for the production of these hydrolysates (pH, 8.0; E:S, 1:200). We believe further studies focused on these bioactive substances will enable them to be utilized as therapeutic ingredients and be included in diets for enteral or oral feeding.

#### 4. CONCLUSIONS

This study demonstrated that goat casein tryptic hydrolysates biological activities depends on the hydrolysis conditions. Antioxidant activity ranged from 1605.0 to 3245.70  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TROLOX equivalent $\cdot\text{mg}^{-1}$  of the peptides demonstrating values compatible with pattern antioxidants substances such as C vitamin, tocopherol and BHA. The MIC value was 0.98 and 1.92  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  for *E. coli* and *B. subtilis*, respectively. All retentate peptides presented an MIC of 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  against *En. faecalis* ATCC 6057, *E. coli* ATCC 25922, and *K. pneumoniae* ATCC 29665. Tested casein peptides (pH 7.5; E:S 1:250 and DH 23.7%) exhibited large zinc-carrying capabilities, binding to almost 82% of available zinc. Therefore, we presume these hydrolysates have a potential for being used as food supplements. The identified peptides displayed bioactivity; hence they can be used as functional foods and food additives in minimizing oxidative reactions. Nevertheless, for an eventually recommendation of their inclusion in daily diet, as an array of health promotion; more detailed studies are needed with the purpose of elucidating a more precise mechanism by which these peptides show their bioactivity.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to CAPES, CNPq, FACEPE and São Miguel College for the financial support. We would like to thank the ITEP-PE and CETENE for allowing us to perform the zinc analysis using ICP-OES and the peptide profile analysis using MALDI-TOF-MS.

#### Conflicts of interest

The authors declared that they have no conflicts of interest.

## References

- Adamson, N. J., E. C. Reynolds. 1997. Relationship between degree of casein hydrolysis and phosphopeptide release. *J. Dairy Res.* 64: 505-514
- Alli, I., M. Okoniewska, B. F. Gibbs, Y. Konishi, 1998. Identification of peptides in cheddar cheese by electrospray ionization mass spectrometry. *Int. Dairy J.* 8: 643-649.
- Birkemo, G. A., O. O'Sullivan, R. P. Ross, C. Hill, 2008. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum *J. Appl. Microb.* 106: 233–240.
- BRASIL, 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. *Diário Oficial da União*, 183: 13-22.
- Bruns, R. E., I. S. Scarminio. B. Barros Neto, 2006. *Statistical design- hemometrics*. Amsterdam: Elsevier, 412p.
- Benkerroum, N. 2010. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 3: 320–338.
- Centenaro, G. S., C. Prentice-Hernández, M. Salas-Mellado, 2009. Effect of substrate and enzyme concentrations on the hydrolysis degree and the functional properties of protein hydrolysates of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) *Quim. Nova*, 32, 7: 1792-1798.
- Contreras, M. M., R. Carrón, M. J. Montero, M. Ramos, I. Recio, 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19: 566-573.
- Contreras, M. M., B. Hernández-Ledesma, L. Amigo, P. J. Martín-Álvarez, I. Recio, 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate

- with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci. Technol.* 44: 9-15.
- Corrêa, A. P. F., D. J. Daroit, J. Coelho, S. M. M. Meira, F. C. Lopes, J. Segalin, P. H. Risso, A. Brandelli, 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J. Sci. Food Agric.* 91, 12: 2247-2254.
- Cuollo, M., S. Caira, O. Fierro, G. Pinto, G. Picariello, F. Addeo, 2010. Toward Milk speciation through the monitoring of casein proteotypic peptides *Rapid Commun. mass Spec.* 24: 1687-1996.
- Dashper, S. G., S. Liu, E. C. Wand Reynolds, 2005. Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2322- 2328.
- Egito, A. S., G. M. S. Rosinha, L. E. Laguna, L. Miclo, J.M. Girardier, J.L. Gaillard, 2006. Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:932-939.
- Farvin, K. H. S., C. P. Baron, J. Otte, C. Jacobsen, 2010a. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. *Food Chem.* 123, 4:1090-1097.
- Farvin, K. H. S., C. P. Baron, N. S. Nielsen, C. Jacobsen, 2010b. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1 – In vitro assays and evaluation in x-3 enriched milk. *Food Chem.* 123, 4: 1081–1089.
- Fitzgerald, R.J., B. A. Murray, 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 59:118-125.
- Frenhani, P.B., R. B. Burini, 1999. Mechanisms of absorption of amino acids and oligopeptides. *Arq. Gastroenterol.*, 36: 227-237

- Forssmann, W.G., H. D. Zucht, M. Raida, K. Adermann, H. J. Magert, 2003. Antibiotic peptides from bovine milk United States Patent 657984917. 17 June 2003.
- Gibson, R.S., A. M. Heath, M. L. S. Limbaga, 2001. Are changes in food consumption patterns associated with lower biochemical zinc status among women from Dunedin. *New Zealand Br J Nutr.* 86:71-80.
- Gomez-Ruiz, J., I. Lopez-Exposito, A. Pihlanto, M. Ramos I. Recio, 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Eur. Food Res. Technol.*, 227: 1061-1067.
- Haque, E., R. Chand, 2008. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur Food Res Technol.* 227:7–15.
- Hancock, R. E. W., R. Lehrer, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics *Tibtech*, 16: 82-88.
- Hunter, T., 2000. Signalling -2000 and beyond. *Cell*, 100:113-27.
- Hernández-Ledesma, B., B. Dávalos, B. Bartolomé, L. Amigo, 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS *J. Agric. Food Chem.* 53: 588-593.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Horwitz, W. (Ed.) International. 17 th ed. Gaithersburg: AOAC international, 2000.
- Hill, R. D., E. Lahav, D. Givol, 1974. A rennin-sensitive bond in  $\alpha$ -s1 B-casein. *J. Dairy Res.* 41: 147- 153.
- Jiang, J., S. Chen, F. Ren, Z. Luo, S. S. Zeng, 2007. Yak Milk Casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *J. Dairy Res.* 74: 18-25.



- Lahov, E., D. Edelsten, M. T. Sode-Morgensen, E. Sofer, 1971. Properties of basic glycopeptides from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft* 26:489–495.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193,1: 265-275.
- Malin, E.L., M. H. Alaimo, E. M. Brown, J. M. Aramini, M. W. Germann, H. M. Farrell, P. L. McSweeney Jr, P. F. Fox, 2001. Solution structures of casein peptides: NMR, FTIR, CD, and molecular modeling studies of alphas1-casein *J. Protein Chem.* 1–23, 20: 391–404.
- Meisel, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8: 363–373.
- Morato, A. F., R. L. Carreira, R. G. Junqueira, M. P. C. Silvestre, 2000. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin *J. Food Comp. Anal.* 13, 3: 101.
- Nalinanon, S., B. Hideki Kishimura, F. Shahid, 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.* 124 13:54–1362.
- Kim, G. N., H. D. Jang, C. I, Kim, 2007. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. *Food Chem.* **104**: 1359–1365.
- Kitts, D. D., K. A. Weiler, 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1309–1323.
- Lira, T. B. F., V. S. Bezerra, F. O. Silva, G. M. P. Dias, J. L. Lima Filho, T. S. Porto, A. L. F. Porto, 2010. Evaluation of the variables that influence the enzymatic hydrolysis of Moxotó goat's milk casein *Pesq. Agropec. Bras.*, 45, 9: 1036-1043.

- Lopez-Exposito, I., J. A. Gomez-Ruiz, L. Amigo, I. Recio, 2006. Identification of antibacterial peptides from ovine  $\alpha$ 2-casein. *Int. Dairy J.* 16: 1072-1080.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 4: 407–412.
- Marshall, K. (2004). Therapeutical applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136–156.
- McCann, K. B., B. J. Shiell, W. P. Michalski, A. Lee, J. Wan, H. Roginski, 2005. Isolation and characterization of antibacterial peptides derived from the f(164–207) region of bovine  $\alpha$ 2-casein. *Int. Dairy J.* 15: 133–143.
- Malkoski, M., S. G. Dashper, N. M. O'Brien-Simpson, G. H. Talbo, M. Macris, K. J. Cross, E. C. Reynolds, 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2309-2315.
- Ming, L. J., J. D. Epperson, 2002. Metal binding and structure –activity Relationship of the Metalloantibiotic Peptide Bacitracin. *J. Inorg. Biochem.* 91: 46-58.
- NCCLS, 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7-A5. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Otte, J., S. M. Shalaby, M. Zakora, A. H. Pripp, S. A. El-Shabrawy, 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of sub strate, enzyme and time of hydrolysis. *Int. Dairy J.* 17: 488–503.

- Silva, A. A., J. C. Adrião, M. Jimenez, J. C. Santos, M. C. R., Wischral, A. J. A. B Afonso, 2007. Genetic polymorphism of the  $\alpha$ 1-Casein in goat from the semi-arid of Brazilian Northeast Ci. Anim. Bras . 29, 3: 255-259.
- Srinivas, S., V. Prakash, 2010. Bioactive Peptides from Bovine Milk  $\alpha$ -casein: Isolation, Characterization and Multifunctional Properties Int. J. Peptides Res. Ther, 16: 7-15.
- Shah, N. P., 2000. Effects of milk –derived bioactive: an overview. Brit. J. Nutr. 1: S3-S10.
- Su, R., W. Qi, Z. He, S Yuan, Y. Zhang, 2007. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: identification and release kinetics of phosphopeptides. Food Chem.104: 276-286.
- Suetsuna, K., H. Ukeda, H. Ochi, 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. J. Nutr. Biochem. 11,3: 128-131.
- Qi, W., Z. He, D. Shi, 2003. Product distribution of casein tryptic hydrolysis based on HPSEC analysis and molecular mechanism. Chem. Eng. Sci. 58: 767-775.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med. 26, 9-10: 1231-1237.
- Rizzello, C. G., I. Losito, M. Gobbetti, T. Carbonara, M. D. De Bari, P. G. Zambonin, 2005. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties J. Dairy Sci. 88, 7: 2348-60.
- Silva, S. V., A. Pihlanto, X. F. Macalcata, 2006. Bioactive Peptides in Ovine and Caprine Cheeselike Systems Prepared with Proteases from *Cynara cardunculus*. J. Dairy Sci. 89:3336–3344.

Silva: M.M.C., R. A. Torres, M. T. Rodrigues, M. A. M. Soares, A. C. M. Magalhães, S. P. Silva, T. S. Silveira, 2009. [Effect of genotypes for  $\alpha$ 1 -casein on proteic and lipidic fractions in goat milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61, 3: 682-69.

Suetsuna, K., H. Ukeda, H. Ochi, 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activity peptides derived from casein *J. Nutr. Biochem.* 11: 128–131.

-Parrilla. 2004.  
The antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64,2:501-509.

Wang, J., K. Green, G. McGibbon, B. Maccarry, 2007. Analysis of effect of casein phosphopeptides on zinc binding using mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 1546–1554.

## Captions for Tables

Table 1. Effect of pH, E:S, DH, antioxidant and zinc carrier activity in peptides from Moxotó.

Table 2. Statistically significant main effects and interactions estimated from the hydrolysis degree (DH) and antioxidant activity (TEAC) values listed in Table 1. \*Not significant. The main effects were nevertheless retained in the models for hierarchical reasons.

<sup>a</sup> hydrolysis of degree

<sup>b</sup> antioxidant activity pool

<sup>c</sup> antioxidant activity permeate

<sup>d</sup> antioxidant activity retentate

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration of goat casein tryptic hydrolysates test sample for the 6, obtained at pH 8.0 and E: S 1:200 contained in the retentate (> 3000Da) and permeate (<3000Da).

## Captions for figures

Figure 1. MALDI-TOF spectrum of peptides present in the permeate (<3000Da) of tryptic hydrolysis of casein with caprine DH 28.86% detected by mass spectrometry.

Figure 2. Fragmentation of the peptide by MS / MS, parent ion A. 1383.6, B. 2163.9Da, using the program Bruker Daltonics Flex Analysis Inc.

Test	Coded level		Decoded level			TEAC <sup>1</sup>			Zinc-binding Carrier	
	pH	E:S	pH	E:S	DH%	Pool of peptides	Permeate (̳3000Da)	Retentete (̳3000Da)	IC <sub>50</sub> (mg/g)	%
1	-1	-1	7.5	1:250	23.7	2403.8 <sup>Bc</sup>	2881.0 <sup>ABb</sup>	3242.3 <sup>Aa</sup>	7.08±0.05	81.76
2	+1	-1	8.5	1:250	19.8	1605.8 <sup>Cb</sup>	1763.7 <sup>Cb</sup>	2123.1 <sup>Ba</sup>	10.67±0.13	73.40
3	-1	+1	7.5	1:150	18.2	2188.2 <sup>Db</sup>	3245.0 <sup>Aa</sup>	1790.5 <sup>Cb</sup>	-	-
4	+1	+1	8.5	1:150	14.7	1893.9 <sup>Db</sup>	2340.0 <sup>BCa</sup>	1730.4 <sup>Cc</sup>	-	-
5	0	0	8.0	1:200	28.5	3015.9 <sup>Aa</sup>	2142.0 <sup>Bab</sup>	1989.4 <sup>Bc</sup>	-	-
6	0	0	8.0	1:200	28.6	3042.6 <sup>Aa</sup>	2188.2 <sup>Bab</sup>	2060.6 <sup>Bc</sup>	4.46±0.21	75.47
7	0	0	8.0	1:200	28.9	2976.2 <sup>Aa</sup>	2188.2 <sup>Bab</sup>	2188.2 <sup>Bc</sup>	-	-
8	0	0	8.0	1:200	28.8	2858.4 <sup>Aa</sup>	2222.5 <sup>Bab</sup>	2078.3 <sup>Bc</sup>	-	-

Table 1.

Table 2.

Factors	Effect			
	DH <sup>a</sup>	TEAC pool <sup>b</sup>	TEAC <3000Da <sup>c</sup>	TEAC >3000Da <sup>d</sup>
<b>pH</b>	-13.89	-6.72	-2.15*	-15.25
<b>E:S</b>	-19.00	0.44*	0.99*	-22.71
<b>1*2</b>	1.09*	3.10*	0.23*	13.91

Table 3.

<b>Microorganism</b>	<b>Pool</b>	<b>Permeate(&lt;3000Da)</b>	<b>Retentete(&gt;</b>
	<b>(mg/mL)</b>	<b>(mg/mL)</b>	<b>(mg/mL)</b>
<b><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057</b>	-	-	20.00
<b><i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633</b>	-	0.98	-
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	-	1.95	20.00
<b><i>Pseudomonas auroginosas</i> ATCC 27853</b>	-	-	-
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665</b>	-	-	20.00
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</b>	-	-	-



Figure 1.

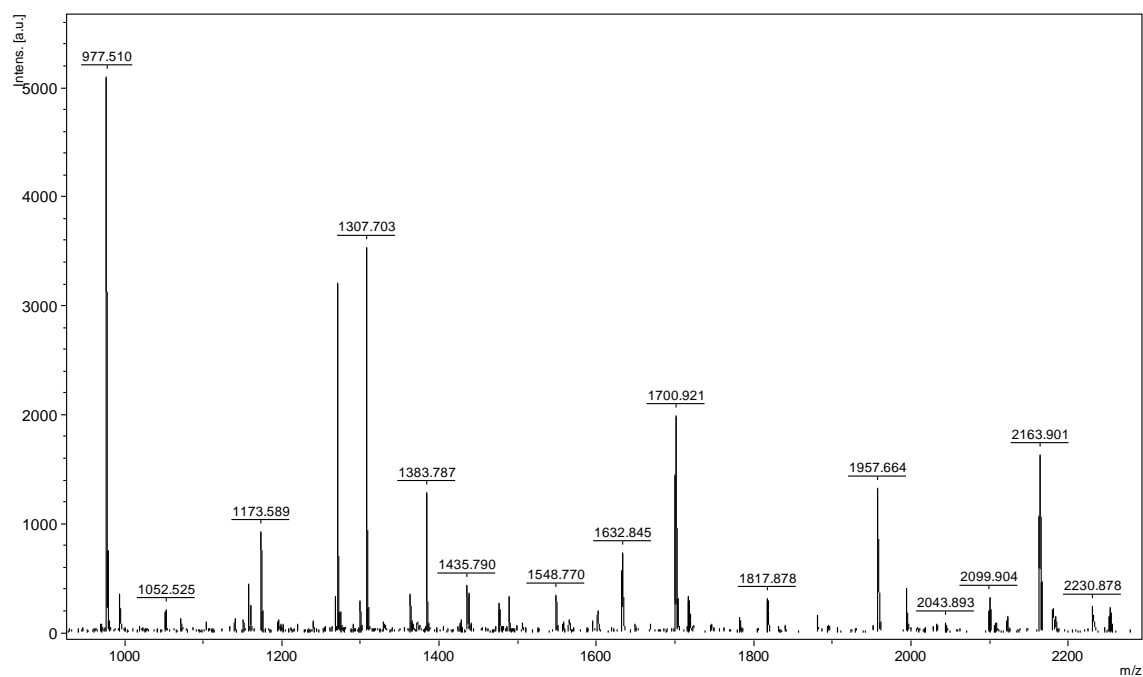


Figure 2A

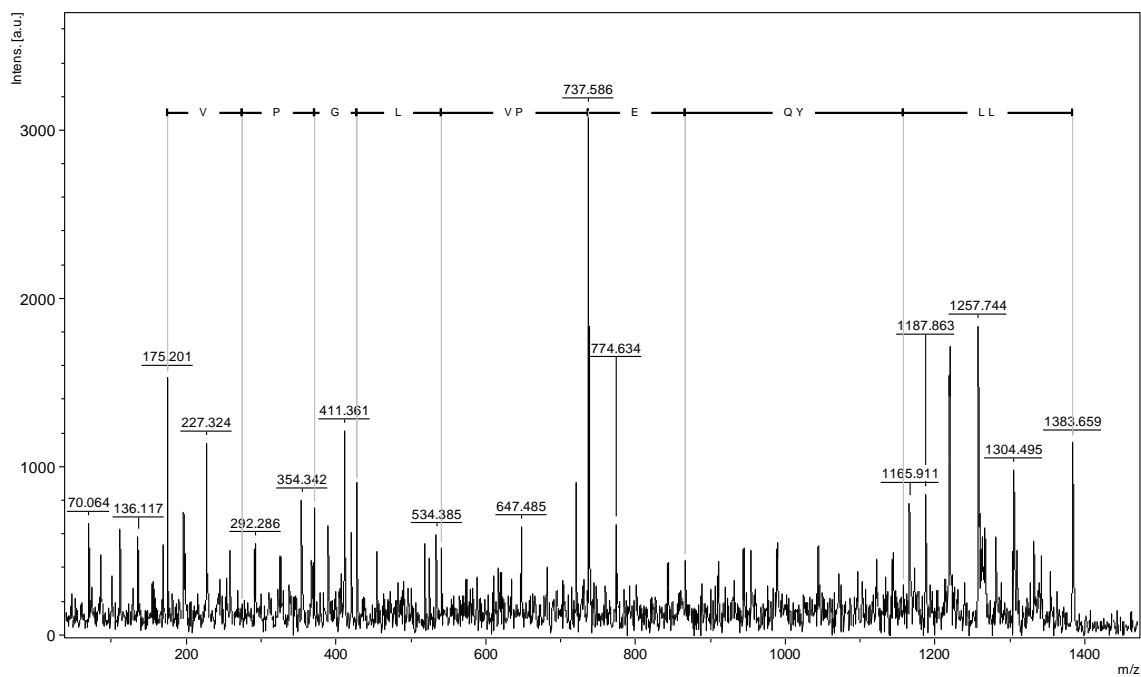
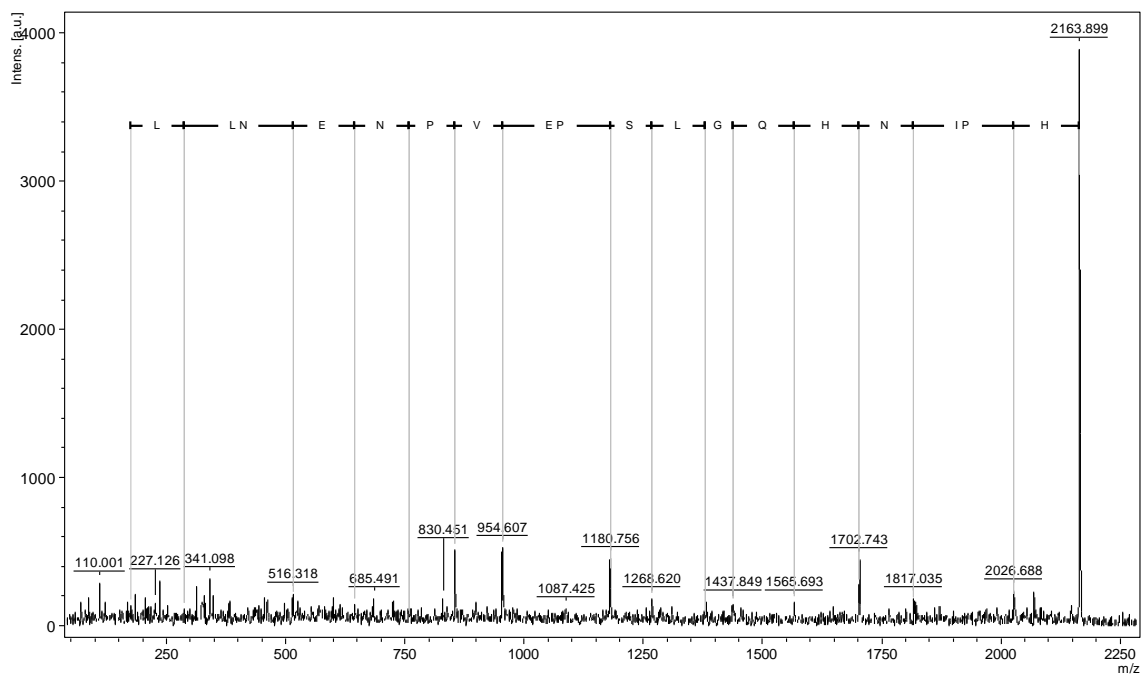


Figure 2B



<b>Assunto:</b>	JDR3561
<b>De:</b>	JDR (JDR@hannahresearch.org.uk)
<b>Para:</b>	villsb@yahoo.com.br;
<b>Cc:</b>	eneeds@jdredit.co.uk;
<b>Data:</b>	Terça-feira, 20 de Março de 2012 4:44

Dear Dr Sobral Bezerra,

Thank you for submitting your paper.

Your manuscript “Peptides with antioxidant activity obtained by caprine casein hydrolysis using *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 protease” has been given the Identification: JDR3561 (please quote this reference in all correspondence) and date of receipt, 20 March 2012.

The paper will be assessed by the editors and, if appropriate, by independent referees.

Your paper will be handled by my co-editor, Eric Needs ([e.needs@hannahresearch.org.uk](mailto:e.needs@hannahresearch.org.uk)). He will be in touch when the evaluation is complete.

Yours sincerely,

David Chamberlain, Editor

**Peptides with antioxidant activity obtained by caprine casein hydrolysis  
using *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 protease**

Artigo submetido ao Journal of Dairy Research

Fator de Impacto: 1,848 JCR 2008

## **Antioxidant activity of caprine milk casein hydrolysates**

### **Peptides with antioxidant activity obtained by caprine casein hydrolysis using *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 protease**

Vilma Sobral Bezerra<sup>1, 3</sup>, Carolina Albuquerque Lima<sup>3</sup>, Roberto Afonso da Silva<sup>1,3</sup>, Júlia Furtado Campos<sup>2</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>3</sup> and Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos – LABTECBIO/DMFA. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>2</sup> Centro de Tecnologias Energéticas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz Freire, n.01 Cidade Universitária, CEP: 50740-540. Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopathologia Keizo Asami (LIKA) / Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50780-901. Recife, Pernambuco, Brazil

\*Author for correspondence: Vilma Sobral Bezerra [villsb@yahoo.com.br](mailto:villsb@yahoo.com.br)

## **Peptides with antioxidant activity obtained by caprine casein hydrolysis using *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 protease**

### **Abstract**

This study aims the production of caprine milk casein peptides with antioxidant activity by casein hydrolysis. For this purpose we used a *Penicillium auratiogriseum* URM4622 protease. A complete two levels factorial design with three variables was employed to identify the most significant parameters for casein hydrolysis and antioxidant activity. Antioxidant activity using the TROLOX equivalent was determined by ABTS radical scavenging assay, which was tested to screen casein hydrolysates activity. The most favorable hydrolysis conditions were pH 9.0, enzyme-substrate ratio of 1:125 and 3 h, which led to a hydrolysis degree of 28.6%. Casein hydrolysates antioxidant properties showed activity between 843.17 and 2587.30  $\mu\text{M}$  of TROLOX equivalent/mg of peptides, when hydrolysis degrees are respectively 9.6% and 27.0%, which was negatively influence by pH. The amino acids sequence LLYQEPVLGPVRGPFPI was a  $\beta$ -casein fragment, which presented antioxidant properties. Amino acids residues such as Pro and Lys were crucial for the incorporation of these bioactive peptides with additives in foods, in order to minimize oxidation reactions or functional ingredients.

**Keywords:** *Penicillium aurantiogriseum*, bioactive peptides, caprine milk casein

## Introduction

Bioactive protein products represent a source of health improvable food components and can be incorporated in functional foods (Roman & Sgarbieri, 2005). Milk proteins are latent and inactive in primary protein sequence, requiring proteolytic enzymes action to provide their bioactive properties (Jiang et al. 2007). Industrial applications of these enzymes to products as well as their use in food preservation have been related (Hammershøj et al. 2008). Their large potential for application in different fields has also been investigated. The interest comes from these enzymes ability to catalyze hydrolytic reactions due to substrate specificity (Shuji et al. 1991).

Fungi and bacteria proteases are commercially produced in considerable quantities. The latter has been preferable, because fungi produce extracellular enzymes, which facilitate enzyme recovery. Among fungi group, *Penicillium* genus contains many proteases producers species (Jiang et al. 2007). *Penicillium* proteases were studied for bioproducts production in food industry (Germano et al. 2003), however, their employment in bioactive peptides production from milk proteins has been less utilized.

Proteins enzymatic hydrolysis aims the improvement of original protein nutritional and functional properties. Separation and purification techniques are used to isolate active peptides hydrolysates. These peptides may have a large number of biological properties, such as opioid, antimicrobial, antioxidant and anti-hypertensive activities (Kitts & Weiller 2003, Hayes 2006, Otte et al. 2007). Studies relative to fish protein, soy, citrus fruits and milk casein incorporation into food products are determinant to nutraceuticals manufacture, especially in food preservation and oxidative reactions minimization (Gómez-Ruiz et al 2008).



Oxidation is an essential process in all living organisms, although its side effect is the production of free radicals (Di Bernardini et al., 2011). Free radicals, produced in excess or not eradicated, can attack the nearest molecules, subtracting their electrons, which can start a chain reaction in the new molecule with one missing electron, or attack other molecules (Kaur & Kapoor, 2001). Food oxidation is the main cause of food spoilage, however, many non-enzymatic antioxidants can be used to reduce free radicals harmful effects. Natural antioxidant present in fruits and vegetables can be used for this purpose (Di Bernardini et al 2011, Meisel & Bockelmann 1999; Farvin Sabeen et al 2010). Milk proteins peptides were used for this purpose. Biological activity reports of Moxotó goats casein were not described yet.

The objective of this study was the production of peptides with antioxidant activity, from Moxotó goat milk casein hydrolysis, using a protease produced by *P. auratiogriseum* URM4622. A complete two levels factorial design with three variables was used to identify the most relevant parameters for casein hydrolysis and antioxidant activity, using the identified peptides profile by MALDI-TOF, followed by peptide fragmentation using MS / MS in order to obtain amino acid sequence.

## **Material and Methods**

### *Materials*

All reagents used were of analytical grade. Moxotó breed goat milk was collected in sanitary manner, according to Brasil (2000). Its extraction was carried out in one animal from Sertânia city, state of Pernambuco, Brazil. Milk samples were maintained in liquid nitrogen and were frozen immediately after collection.

### *Casein extraction*

Casein extraction was performed by isoelectric precipitation at pH 4.6, according to Egito et al. (2006) with modifications. The precipitated casein was dissolved in 1.0 M NaOH, pH 7.0, and subjected to dialysis in deionized water at 4 °C for 96 h. Products were frozen dried and stored at -20°C.

### *Protease production by *P. aurantiogriseum* URM4622*

The methodology used to obtain *P. aurantiogriseum* URM4622 protease was described by Lima et al. (2011). The strain was acquired from Mycology Department (Universidade Federal de Pernambuco) culture collection .

### *Casein hydrolysis experimental design*

A screening of the hydrolysis conditions for casein peptides production by *P. aurantiogriseum* URM4622 protease was carried out with a complete two levels factorial design. Hydrolysis time, pH and enzyme-substrate ratio were selected as the three independent variables, whereas the responses were hydrolysis degree (DH) and antioxidant activity. The coded and non coded values selected for the three variables are given in Table 1. Solutions containing 2% (w/v) casein in sodium phosphate buffer were submitted to hydrolysis at 37 °C according to established variables through 2<sup>3</sup> full factorial designs. After hydrolysis, samples were subjected to a shaking step for 30 seconds and placed in a water bath at 90°C for 15 min for enzyme inactivation. In addition, samples were centrifuged at 12,000 x g and supernatants were used to determine hydrolysis degree.

**Insert table 1 here**

### *Determination of hydrolysis degree (DH)*

The determination of casein DH was performed according to Centenaro et al. (2009) with adaptations. The DH was expressed according to the ratio of soluble proteins amounts, determined by Lowry et al. (1951) Folin phenol method - with bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St. Louis MO, USA) in calibration curve preparation,- and total proteins present in casein, which was determined the Kjeldahl method as recommended by AOAC (2000).

### *ABTS radical- antioxidant activity*

Antioxidant activity was determined using ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation according to Re et al. (1999). ABTS was dissolved in ethanol to 1.0 M stock solution. ABTS radical cation was produced by the reaction between 1.0 M stock solution and 2.45 mM potassium persulfate, followed by a standing period in dark at room temperature for 16 h before use. Immediately prior to use, the ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with ethanol to an absorbance of  $0.70 \pm 0.02$  at 734 nm. 0–2.0 M TROLOX acid (6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametichromano-2-carboxylic acid) was used as standard. 30  $\mu$ l sample (0.05–0.8 mg) was incubated for 6 minutes with 3.0 ml standards in diluted ABTS<sup>•+</sup> solution. Following, absorbance was measured at 734 nm using an absorbance spectrophotometer (Micronal model B582; São Paulo-BR). An ethanol blank sample was run in each assay. All determinations were carried out at least 3 times. Inhibition percentage was calculated and plotted as a function of antioxidant concentration and TROLOX for standard.

### *Peptide profile by mass spectrometry and amino acid sequence (MALDI TOF- MS)*

Peptide profile was obtained by MALDI-TOF-MS using Bruker Auto Flex III mass spectrometer (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA), equipped with a Nd-YAG Laser (355 nm). Sample and matrix solution (10 mg·mL<sup>-1</sup>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile with 0.3% trifluoroacetic acid) were mixed, spotted onto a MALDI target plate (MTP 384 Ground Steel, BrukerDaltonics) and dried at room temperature. Spectra were recorded in positive reflection mode with 19 kV acceleration voltage and m/z 500–4480 mass range. Selected parental ions were fragmented in LIFT mode. External calibration was performed using a peptide standard mixture (BrukerDaltonics-USA). Data were acquired by FlexControl 3.0 software (BrukerDaltonics-USA) and spectra were processed by FlexAnalysis 3.0 software (BrukerDaltonic-USA). Obtained amino acid sequences were compared with protein database sequences in NCBI BLAST tool.

### *Statistical analysis*

The results were analyzed by ANOVA ( $P < 0.05$ ) in Statistica 8.0 software.

## **Results and Discussion**

### *Degree of Hydrolysis*

Table1 indicates variables (pH, E:S ratio and reaction time) influences on casein hydrolysis degree, using *P. auratiogriseum* protease, according to the 2<sup>3</sup> factorial design. This statistical model includes: three main variables effects; three interactions between the two main factors and one effect among the three factors. Effects significant estimates (at 95% confidence level) were listed in Table 2. Results demonstrated that the experimental design for hydrolyzed casein protein obtainment,

from the enzyme produced by *P. auratiogriseum* URM4622, had no predictive model for GH, since calculated F value was not greater than the tabulated. Nevertheless, an investigation of variables (reaction time, E:S and pH) effects for acquirement of proteic hydrolisates with bioactive potential was carried out.

### **Insert table 2 here**

A simplified model, based only on significant effects (pH, E: S and reaction time) upon DH indicates that, normally, highest hydrolysis degree is obtained when time (variables 1) is selected at their highest level. Our result indicated three hours as time reaction for the best hydrolysis degree. Thus, the optimal reaction time occurs while time increases between 1 and 3 hours, however there is an evident decrease when it exceeds 3 h. In our study, reaction time had a positive effect on hydrolysis degree. It is known that reaction time is one of the most critical parameter in enzymatic reaction (Roman & Sgarbieri, 2005). Fan et al. (2010), who studied protein hydrolisates with alcalase for 11h, demonstrated that DH was improved when hydrolysis time increases from 1 to 4 h. This result corroborated Lira et al. (2010), who evidenced that degree of hydrolysis can be favored by reaction time increases.

Enzyme reaction time increasement is economically unfavorable, as demonstrated by Carreira et al. (2003), who recommended no more than 5 hours time for hydrolytic reaction, since, after this time, protein preparations favor microbial contamination. Several interactions were significant in goat casein DH (1\*2, 1\*3 and 1\*2\*3), which indicate that the effect of a given variable depends on the levels of the others. Nevertheless, the main effects of variables 2 (pH) and 3 (E:S) were not

significant. However, some interactions were significant: 1\*2 equivalent to time of reaction x pH and 1\*3 equivalent to time of reaction x E:S. This means that, even the effect of a given factor is not significant, it may have a role in interactions with other factors. It should be noted that there was a significant interaction involving variables 2 and 3, although these variables did not show significant effect on DH. Our result showed that interactions between 1\*2 and 1\*3 had adverse effects on DH. Additionally, tertiary interaction between the variables 1\*2\*3 was also negatively significant for DH. However, pH and E:S main variables, as well as the interaction between pH x E:S (2\*3) were not significant. In this respect, it should be noted that the highest are DH values, the highest are reaction time and pH values. However, the increase in reaction time should be accompanied by a decrease in E:S, in order to hydrolysis degree increment.

Kristinsson & Rasco (2000) reported that the higher is protease concentration the higher is DH. However, the results showed that E:S decreases coupled with time of reaction increases caused improvement of DH, which also reduces costs by using smaller enzyme amounts, when it is used in industrial scale.

Caprine casein DH, produced by *P. auratiagriseum* URM4622 proteases, are specified in table 3. Caprine milk casein hydrolysis was monitored for a period between 1 to 5 h. A noteworthy fact was that the DH after 3 h, at pH 9.0 and E:S 1:125, had increased significantly to 28.6%. Srinivas & Prakash (2010) demonstrated that casein is susceptible to proteases with different specificities. They obtained DH values of 0.7% with aminopeptidase, 0.4% with carboxipeptidase, 4.6% with chymotrypsin, 4.2% with bacterial protease and 70% with fungal protease, at pH 7.0, 2h time reaction, temperature of 37°C and E:S 1:150.

According to Srinivas & Prakash (2010), the hydrolysis of bovine milk  $\alpha$ -casein with a protease produced by *Streptomyces griseus*, at 37 °C for 2 h, resulted in a 4.2% DH . However, Jiang et al. (2007), studying protein hydrolysis with neutrase (pH 7.0) and alcalase (pH 8.0) at 45°C for 3 h, yielded hydrolysates with 5.6% and 11.3% DH, respectively. On the other hand, ovine milk cheeses curdled with protease extracts from *Cynara cardunculus* flowers were characterized by  $\beta$  and  $\alpha$ s1-caseins extensive hydrolysis, showing a DH of 75% and 82%, respectively (Macedo & Malcata 1997). Increase in the degree of hydrolysis makes it possible to obtain peptides with biological properties, however, an extensive hydrolysis can be detrimental to this activity (Centenaro et al. 2009).

#### *Antioxidant activity*

The influence of reaction pH, E:S ratio and reaction time on antioxidant activity, according to 2<sup>3</sup> factorial design, are specified in table 1. Significant effects of pH, E: S ratio and reaction time on antioxidant activity (TEAC) was assessed. Among variables, pH was the one which influenced most antioxidant activity; it affected negatively this parameter. Casein hydrolysates goat milk best antioxidant activity was obtained at pH 9.0. It is well known that one of the most important parameter influencing enzymatic activity is the pH. A pH value of 9.0 coincides with the optimum pH for enzyme produced by *P. auratiogriseum* URM4622 (Lima et al 2011). Proteins hydrolysis optimum pH is often observed in the ideal action range of the enzyme. It is probably due to the charge of casein peptides amino acid residues, which affects the availability of peptide bonds to enzymatic attack and may alter the obtained products and consequently their biological activity (Morato et al. 2000).

Interactions 1\*3 and 1\*2\*3 influenced negatively and positively, respectively, the antioxidant activity. However, the tertiary interactions between variables 1\*2\*3 must be in the highest level, so that antioxidant activity is favored. Thus, for antioxidant activity increasement to happen, it is necessary an intermediate level of time (variable 1 and 3). Merely the main variable 1 was significant, however, it should be noted that some interactions involving variables 2 and 3 were also significant, even though the main effect of these variable was not.

TEAC values were obtained by the capacity of each sample to scavenger the ABTS<sup>+</sup> up to 6 minutes of reaction time. These results (table 3) were expressed in  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  of TROLOX/mg of protein. In this study the best condition in order to obtain peptides with antioxidant activity was a reaction time of 3 hours, E: S ratio 1:125 and pH 9.0, which presented antioxidant activity for  $2587.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of TROLOX/mg of protein. Ours results were better than Gupta et al. (2009), who obtained values of  $16.6 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of TROLOX/mg of protein and  $9.76 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of TROLOX/mg of protein, by searching antioxidant activity in cheese at different stages of ripening.

### **Insert table 3 here**

Casein hydrolysates have previously demonstrated antioxidant effects and some studies have examined their potential for use as food additives (Díaz & Decker 2004). These antioxidant peptides and hydrolysates might also be employed in preventing oxidation reactions that leads to foods deterioration and foodstuffs (Corrêa et al. 2011).

Peptides obtained from proteolysis of various food proteins are reported to possess antioxidant activities (Miller et al. 1993). Thus, the evaluation of caprine casein



peptides TEAC values in comparison with the literature, using same methods, indicates that antioxidant capacity is comparable to some wines (Villaño et al. 2004) and others standard antioxidants such as BHA(3-tert-butyl-4-hydroxynisole), which presented a TEAC of  $2430.0\mu\text{mol.L}^{-1}$  of TROLOX/mg of protein (Contreras et al. 2011). Additionally, these peptides presented greater antioxidant activity than  $\alpha$ -tocopherol and C vitamin, which showed TEAC values of 970 and 990  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  of TROLOX/mg, respectively, after 6 min of reaction (Miller et al. 1993).

One explanation for caprine milk casein hydrolyzed antioxidant activity refers to peptides size or amino acid content produced in hydrolytic process. Moosmann & Behl (2002) had reported that accessibility to oxidant-antioxidant test systems is greater for small peptides and amino acids than it is for large peptides and proteins. According to Suetsuna et al. (2000), short peptides are the main responsible for antioxidant activity. Moreover, the differences in free radicals, from hydrolyzed peptides, activities can be attributed to amino acids structural differences (size and sequence) as well as to protease, which was used in goat milk casein peptide bonds degradation, specificity (Chen et al. 1995). However, experimental conditions such as pH and reaction time can also influence bioactives peptides production (Yin et al. 2008). Thus, probably, caprine casein hydrolyzed antioxidant activity are relative to the presence of peptides rich in amino acids such as histidine, arginine, lysine, proline, phenylalanine, tryptophan and tyrosine, as well as the protein conformation (Kitts & Weiler 2003). According to Anne (2006), tryptophan and tyrosine have the special capability to serve as hydrogen donors, due to the presence of phenolic and indolic groups.

Peptidic Profile of caprine casein peptides by MALDI-TOF

MALDI TOF MS mass spectrometry was used for the purpose of caprin casein antioxidant peptides, hydrolysed by *P. auratiogriseum* URM4622, identification and characterization. The sample used in this experiment was obtained in the following conditions: 3h time reaction, E:S 1:125, 9 pH and 28,5% hydrolyse degree. We obtained 17 peptides, presumably bioactive peptides, with a small size between 5 and 15 amino acids residues. Among them, eight were peptides concretely, with molecular weights (MW) of 523.8, 665.8, 977.5, 1700.8, 1781.8, 1894.9, 1993.9 and 2106.9 Da. They have been previously detected in present inherent characteristics of antioxidant peptides (figure1). Those peptides, previously described by Gómez-Ruiz et al. (2008), Sabeena Farvin et al. (2010) and Santillo et al. (2009), presented detected antioxidant activity. Additionally, the peptide with MW 1717.8 Da was previously isolated by Srinivas & Prakash 2010, who detected multifunctional properties, including antioxidant activity.

### **Insert figure 1 here**

#### *$\beta$ -casein* peptides sequencing by MS-MS

Peptides with more intensity of mass/charge were used to determine amino acids sequence. Generally, ion (z) charge is +1 and hence m/z can be compared to peptides molecular mass. Y series amino acids sequence was confirmed by the determination of B series. Almost 90% of the peptides identified shared structural homology with those previously described.

In figure 2, MS/MS fragmentation of the peptide LLYQEPVLGPVRGPFPI are marked, as an example. Mass spectrometry analysis was carried for the more intense ion (2106.9 Da), which had its identity confirmed by Flex analysis database

searches on the MS/MS spectrums of peptides. Part of this sequence was also identified. The peptides MW 977.4, 1700.9, 1894.8 and 2008.4 Da refers to the sequences QEPVLGPVR, VVPPFLQ, LLYQEPVLGPVRGPF and LLYQEPVLGPVRGPF, respectively. These peptides constitute the fractions of  $\beta$ -CN (f194-202),  $\beta$ -CN (f103-109),  $\beta$ -CN (f191-206) and  $\beta$ -CN (f191-207), respectively (Table 4).

**Insert figure 2 here**

**Insert table 4 here**

This peptides represented caprine  $\beta$ -casein N terminal, which differed from the bovine milk in the 210 amino acid position (glutamic acid in caprine; glutamine in bovine milk) and in 223 amino acid position (leucine in caprine; isoleucine in bovine milk) (Santillo et al. 2009). Consequently, the peptides mentioned above, which were previously described as presenting an antioxidant activity, contain Pro residues of  $\beta$ -CN. This protein fraction, as in the majority of casein, contains 16% Pro, and almost all peptides obtained from this protein in the present study contained at least one Pro residue (Birkemo et al. 2009). Studies carried out with peptides from different proteins source have reported that the role of bioactive peptides through different radical mechanisms are related with the prevalence of hydrophobic amino acids, such as Ala, Pro, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr and Met (Birkemo et al. 2009).

As shown in table 4, one or more of these amino acids are contained in all detected peptides, specifically Tyr and Trp, which have been described by various authors as the main responsible for antioxidant activity (Birkemo et al. 2009; Sabeena Farvin et al. 2010; Contreras et al. 2011). These authors obtained, by MALDI-TOF, casein

peptides, which represents the sequences of  $\beta$ -casein in the regions  $\beta$ -CN (f191-208) and  $\beta$ -CN (f191-207), rich in Tyr and Trp, and exerted antioxidative activity.

*Protease Specificity obtained from P. aurantiogriseum URM4622*

In terms of enzymatic specificity, it was found that caprine casein breakdown site, using protease produced by *P. aurantiogriseum* URM4622, was Arg-Phe and Arg-Lis for  $\alpha$ s1-casein (data not shown) and mainly Phe-Leu. It was also observed breaks between Val-Val, Tyr-Gln, Arg-Gly, Pro-Ile and Ile-Leu for  $\beta$ -casein, producing several peptides as those demonstrate in figure 3. Probably, these peptides variety is caused by microbial proteases which shown different specific peptides bond-breaks (Srinivas & Prash, 2010). Microbial proteases action are able to cause specific and nonspecific breaks, which can lead to protein structural changes and allow bioactive peptides production maximization. Lima et al. (2011), studying the specificity of *P. aurantiogriseum* URM4622 using collagen with substrate, showed that this enzyme could be classified as a serine collagenolytic protease, which efficiently decomposes several proteins substrates, including azocasein. On the other hand, in the literature, no more reports were found in relation to the use of microbial protease obtained by using goat milk casein or other protein substrate. However, the identification of microbial proteinases specificity on casein was identified in the literature. Hammershøj et al. (2008) demonstrated that alcalase and flavorzyme can be considered as serine-endopeptidase with a broad specificity for peptide bonds. These enzymes showed endo and exo-peptidase activities; they preferably hydrolyze Leu amino acid, but it could include others amino acids, such as Pro. In spite of no demonstration, Arg and Lys amino acids represented secondarily this protease hydrolysis target, which was, partially, similar to our result.

**Insert figure 3 here**

According to Salami et al. (2008), the extent of proteolysis using a microbial protease depends on enzyme specificity and on the manner which peptide bond becomes accessible to protein peptide bonds. In relation to fungal proteases activities, they act as a mixture of endo and exopeptidase, which results in hydrolysates obtention with a high degree of hydrolysis and can produce peptides with good biological quality (Adler-Nissen 1986, Irigoyen et al. 2000). Minervini et al. (2003), reported that *Lactobacillus helveticus* cell wall protease is associated with a serine proteinase, which is an enzyme accessible for bioactive peptides generation from different animal species CNs; once generated, these peptides were resistant to further degradation.

Additional structural studies are needed in order to confirm peptides structure as well as the mechanism by which they exert their antioxidant activity, since the incorporation of bioactive peptides as functional ingredients in functional foods requires different isolation and characterization steps. Tests should be developed to show the economic viability of using these peptides in industrial scale until their procedure optimization and until when bioactives could be incorporated and marketed as functional foods. Novel investigations should be accomplished in order to discover new bioactive peptides as well as their probable biological functions and health benefits. In addition, structural studies are effective to bioactive sequences identification. There is an agreement with the fact that the allegations must be proven in human studies.

## Conclusions

Moxotó goat milk casein peptides, produced after *P. auratiogriseum* URM4622 protease hydrolysis, demonstrated viability in obtention of hydrolysates with antioxidant activity. The use of kinetic parameters in order to assess degree of hydrolysis proved to be a useful tool in the identification of whose parameters are the best for obtention of hydrolytic peptides rich in interest properties. The identification of peptides profile was carried out in MALDI-TOF while amino acid sequence obtention was performed using MS/ MS, after the peptide fragmentation. Amino acid sequence determination allowed the identification of peptides with biological properties. Thus, as demonstrated in our study, peptides obtention from caprine casein hydrolysis is a feasible approach for food industry. These peptides can be incorporated into functional foods or have applications in oxidation reactions minimizations during food production. Goat milk  $\beta$ -casein peptides antioxidant activity presented consistent antioxidant patterns for food industry application. Further studies, using animal models, should be required to conclude whether these peptides have other biological properties, clear the precise mechanism by which these peptides developed in vivo antioxidant activity and if they can also be used as a food supplement or food additive.

## Acknowledgements

We acknowledge CETENE, ITEP, CAPES, CNPq, FACEPE and São Miguel College for financial support.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Adler-Nissen J** 1986 A review of food protein hydrolysis-specific areas. In: *Enzymic Hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publications, New York. 57-131.
- Anne P** 2006 Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* **16** 1306-1314.
- Birkemo GA, O'Sullivan O, Ross RP, Hill C** 2009 Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology* **106** 233-240.
- BRASIL**. 2000 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa No 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite de cabra. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, **1** 23.
- Carreira RL, Silva VDM, Morais HÁ, Motta S, Junqueira RG, Silvestre MPC** 2003 Optimization of casein hydrolysis to increase small peptide contents: use of pepsin. *Ciência e Agrotecnologia* **27** 625-634.
- Centenaro GS, Prentice-Hernández C, Salas-Mellado M, Netto FM** 2009 Effect of substrate and enzyme concentrations on the hydrolysis degree and the functional properties of protein hydrolysates of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). *Química Nova* **32** 1792-1798.
- Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F** 1995 Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean .beta.-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43** 574-578.

**Contreras MM, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Martín-Álvarez PJ, Recio I**

2011 Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* **44** 9-15.

**Corrêa APF, Daroit DJ, Coelho J, Meira SMM, Lopes FC, Segalin J, Risso PH,**

**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.

**Di Bernardini R, Harnedy P, Bolton D, Kerry J, O'Neill E, Mullen AM, Hayes M**

2011 Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry* 2011, 124(4):1296-1307.

**Díaz M, Decker EA** 2004 Antioxidant Mechanisms of Caseinophosphopeptides and

Casein Hydrolysates and Their Application in Ground Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** 8208-8213.

**Egito AS, Rosinha GMS, Laguna LE, Miclo L, Girardet JM, Gaillard JL** 2006

Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **58** 932-939.

**Fan JB, Zheng LH, Wang F, Guo HY, Jiang L, Ren FZ** 2010 Enzymatic hydrolysis

of silk sericin by proteases and antioxidant activities of the hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry* **34** 382-398.

**Germano S, Pandey A, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR** 2003 Characterization

and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **32** 246-251.



- 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.
- Gupta A, Mann B, Kumar R, Sangwan RB** 2009 Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology* **62** 339-347.
- Hammershøj M, Nebel C, Carstens JH** 2008 Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. *Food Research International* **41** 522-531.
- Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C** 2006 Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology* **72** 2260-2264.
- Horwitz W** 2000 Official methods of analysis of AOAC. *International* 17 th ed. Gaithersburg: AOAC international.
- Irigoyen A, Izco JM, Ibáñez FC, Torre P** 2000 Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **881** 59-67.
- Jiang J, Chen S, Ren F, Luo Z, Zeng SS** 2007 Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*, **74** 18-25.
- Kaur C, Kapoor HC** 2001 Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology* **36** 703-725.
- Kitts DD, Weiler K** 2003 Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* **9** 1309-1323.

- Kristinsson HG, Rasco BA** 2000 Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry* **36** 131-139.
- Lima CA, Filho JLL, Neto BB, Converti A, Carneiro Da Cunha MG, Porto ALF** 2011 Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A variableial study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **16** 549-560.
- Lira TBF, Bezerra VS, Silva FdO, Dias GMP, Lima Filho JLD, Porto TS, Porto ALF** 2010 Evaluation of the variables that influence the enzymatic hydrolysis of Moxotó goat's milk casein. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **45** 1036-1043.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193** 265-275.
- Macedo AC, Malcata FX** 1997 Hydrolysis of  $\alpha$ s- and  $\beta$ -caseins during ripening of Serra cheese. *Food Chemistry* **58** 43-48.
- Meisel H, Bockelmann W** 1999 Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* **76** 207-215.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A** 1993 A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **84** 407-412.
- Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, Fox PF, Monnet V, Gobbetti M** 2003 Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolysec casein of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology* **69** 5297- 5305.

- Moosmann B, Behl C** 2002 Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: Structure-activity relationship. *Molecular Pharmacology* **61** 260-268.
- Morato AF, Carreira RL, Junqueira RG, Silvestre MPC** 2000 Optimization of Casein Hydrolysis for Obtaining High Contents of Small Peptides: Use of Subtilisin and Trypsin. *Journal of Food Composition and Analysis* **13** 843-857.
- Otte J, Shalaby SM, Zakora M, Pripp AH, El-Shabrawy SA** 2007 Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal* **17** 488-503.
- Roman JA, Sgarbieri VC** 2005 Effect of enzymatic hydrolysis on functional properties of bovine casein coagulated by action of quimosin. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. **25** 468-474.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C** 1999 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26** 1231-1237.
- Sabeena Farvin KH, Baron CP, Nielsen NS, Otte J, Jacobsen C** 2010 Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 - Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry* **123** 1090-1097.
- Salami M, Yousefi R, Ehsani MR, Dalgalarrrondo M, Chobert J-M, Haertlé T, Razavi SH, Saboury AA, Niasari-Naslaji A & Moosavi-Movahedi AA** 2008 Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal* **18** 1097–1102.

- Santillo A, Kelly AL, Palermo C, Sevi A, Albenzio M** 2009 Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. *International Dairy Journal* **19** 655-660.
- Shuji A, Yukitaka K, Koji M, Ryuichi M, Hidehiko Y** 1991 Separation of Peptide Groups with Definite Characteristics from Enzymatic Protein Hydrolysate (Food & Nutrition). *Agricultural and biological chemistry* **55** 925-932.
- Srinivas S, Prakash V** 2010 Bioactive peptides from bovine milk  $\alpha$ -casein: Isolation, characterization and multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **16** 7-15.
- 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.
- **-Parrilla MC** 2004 The antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: influence of sample dilution and time. *Talanta* **64** 501-509.
- Yin SW, Tang CH, Cao JS, Hu EK, Wen QB, Yang XQ** 2008 Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, **106** 1004-1013.

## Captions for figures

**Figure 1:** MALDI TOF Spectrum of *Penicillium aurantiogriseum*. casein peptides hydrolysates protease

**Figure 2:** MALDI TOFMS/MS pattern of 2106.9 Da peptide. Interpretation of LLYQEPVLGPVRGPFPI amino acid (obtained from  $\beta$ -casein) MS-MS spectrum.

**Figure 3:** Schematic representation of caprine  $\beta$ -casein that produced the peptides listed in Table 4. Arrows show cleavage sites of protease *Penicillium aurantiogriseum*. (GenBank: CAB39200.1 >gi|4495057|emb|CAB39200.1| beta-casein [Capra hircus])

Figure1

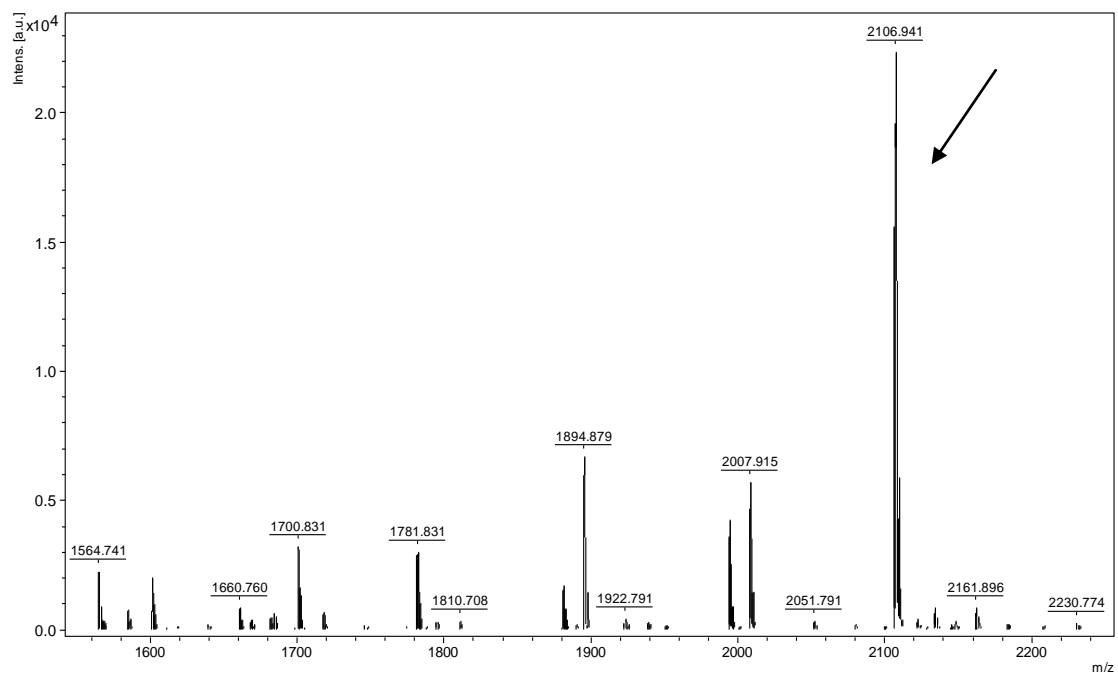


Figure 2

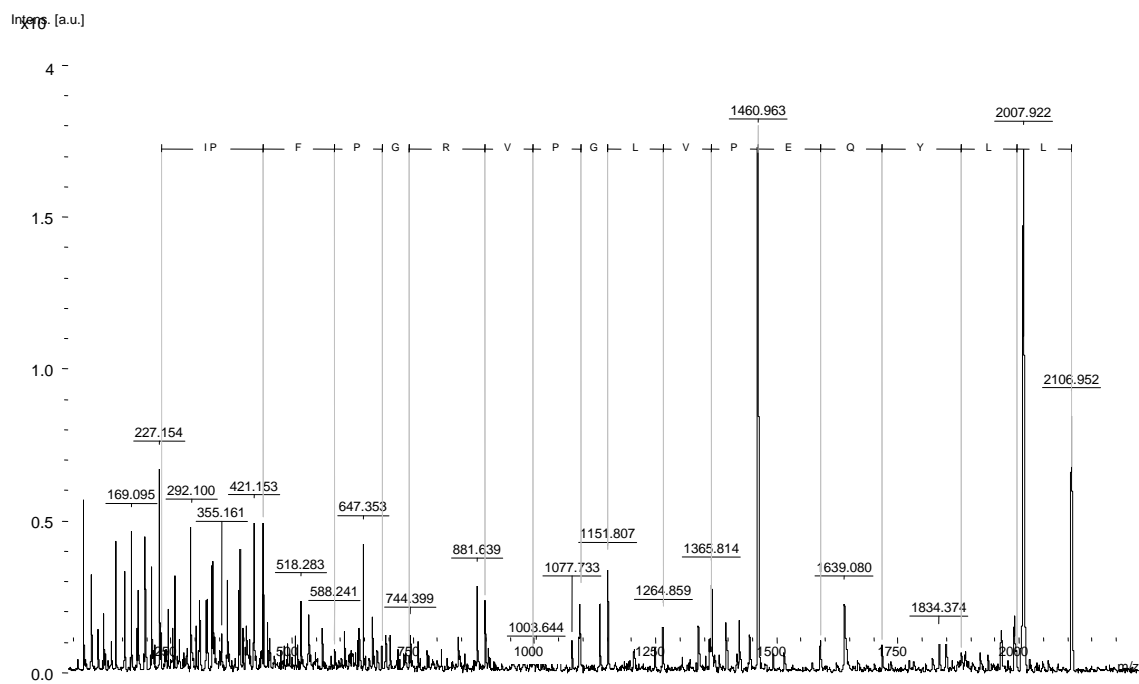
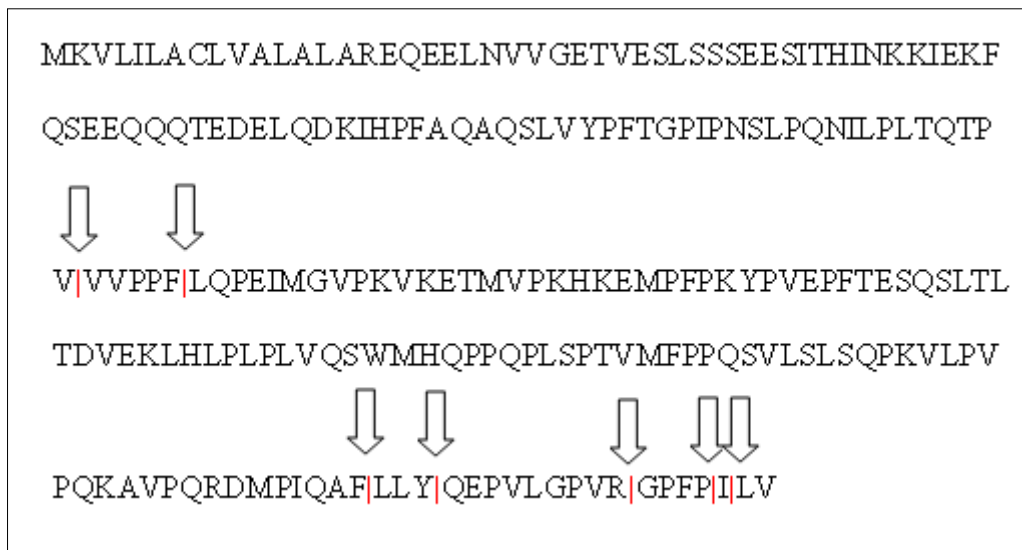


Figure 3.





**Table1.** Variable levels used in the  $2^3$  design to investigate hydrolysis degree and antioxidant activity of casein using *P. aurantiogriseum* URM4622.

Variable	Coded variable Level		
	Lowest (-1)	Central (0)	Highest (+1)
<b>pH</b>	8,5	9,0	9,5
<b>E:S</b>	1:150	1:125	1:100
<b>Time (h)</b>	1	3	5

Table 2. Statistically significant main effects and interactions estimated from the hydrolyses degree ( DH) and antioxidant activity (TEAC) values listed in Table1.

Variables	Effect	
	DH	TEAC
<b>(1)Time (h)</b>	4.062	-1.597*
<b>(2)pH</b>	-1.846*	-12.091
<b>(3)E:S</b>	-2.584*	0.949*
<b>1*2</b>	6.277	3.137*
<b>1*3</b>	-6.277	-10.435
<b>2*3</b>	2.58*	2.945*
<b>1*2*3</b>	-4.062	6.515

\*Not significant. The main effects were nevertheless retained in the models for hierarchical reasons.

Table 3. Effects of independent variables (pH, E:S and time) upon dependent variables (hydrolysis degree and antioxidant activity) in relation to caprine casein hydrolysis by *P. auratiagriseum* URM4622 protease.

Sample	Independent Variables			Dependent Variables	
	pH	Tempo (h)	E:S	DH%	TEAC (μmol.L <sup>-1</sup> TROLOX/mg of peptides)
1	8.5	1	1:150	20.2	1441.9
2	9.5	1	1:150	20.3	2069.3
3	8.5	5	1:150	9.6	843.2
4	9.5	5	1:150	23.9	1123.6
5	8.5	1	1:100	18.0	2210.0
6	9.5	1	1:100	15.0	1096.3
7	8.5	5	1:100	17.1	1244.5
8	9.5	5	1:100	16.7	1122.3
9	9.0	3	1:125	28.3	2410.0
10	9.0	3	1:125	28.6	2511.0
11	9.0	3	1:125	27.1	2505.7
12	9.0	3	1:125	27.0	2587.3

Table 4. Peptides identified from caprine  $\beta$ -casein, obtained by MALDI TOF MS/MS.

X fragmentation by: amino acid not determined.

<i>Molecular weight (Da)</i>	<i>Fraction of casein</i>	<i>Amino acid sequence</i>
977.48	$\beta$ -CN (f194 -202)	QEPVLGPVR
1700.92	$\beta$ -CN (f103-109)	VVPPFLQXXX
1894.80	$\beta$ -CN (f191-206)	LLYQEPVLGPVRGPFPP
2008.40	$\beta$ -CN (f191-206)	LLYQEPVLGPVRGPFPPX
2106.90	$\beta$ -CN (f191-207)	LLYQEPVLGPVRGPFPI

## 7. Considerações Finais

Esse estudo permitiu determinar as melhores condições de hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó são obtidas com a pepsina, em pH 3,0, com relação E:S de 1:100 e 5 horas de hidrólise a 40°C. Observou-se que a hidrólise da caseína caprina é influenciada positivamente pelo pH e pelo tempo de hidrólise, com o uso da pepsina; observando-se interações significativas antagônicas entre pH e relação E:S, com o uso da tripsina; e entre pH, temperatura e tempo de hidrólise, com o uso da papaína. A avaliação dos perfis eletroforético da caseína caprina, demonstrou que a enzima pepsina apresenta uma elevada eficiência na hidrólise de  $\alpha$ 1,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, evidenciada por hidrolisados com massa molar abaixo de 14,4 kDa.

Os hidrolisados de caseína caprina com uso de proteases de origem animal, vegetal ou microbiana, investigadas nesse trabalho, apresentaram propriedades antioxidantes compatíveis a substâncias antioxidantes padrões usados na indústria de alimentos. Estes incluem a vitamina C e E, BHA. Estes achados vislumbra a possibilidade do uso destes antioxidantes proteicos como aditivos na indústria de alimentos, podendo ser usado para minimizar os danos oxidativos das reações de oxidação em alimentos. A propriedade antioxidante desses hidrolisados proteicos deve-se a presença de aminoácidos específicos como tirosina, leucina e triptófano na sequência primária. Entretanto, a configuração espacial do peptídeo, parâmetros cinéticos usados para determinação do grau de hidrólise e a especificidade da enzima proteolítica, são fundamentais para bioatividade desses peptídeos. Adicionalmente, os hidrolisados tripticos da caseína mostraram propriedades antimicrobianas, inibindo *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Ainda mostrou propriedade carreadora de zinco compatível com um padrão de bacitracina. Estas propriedades podem melhorar a funcionalidades de hidrolisados da caseína, o que pode constituir atributo a indústria de alimentos.

A avaliação do perfil peptídico e sequência de aminoácidos dos hidrolisados proteicos da caseína caprina, demonstrou a prevalência de peptídeos da  $\alpha$ -S1- e  $\beta$ -

caseína. O peptídeo da  $\alpha$ -S1caseína, o qual apresenta a sequência HPINHQGLSPEVPNENLLR pode ser utilizado como peptídeo diagnóstico na identificação de variantes genéticas da caseína de várias espécies.

Estudos adicionais devem ser desenvolvidos a fim de determinar o mecanismo específico pelo qual esses peptídeos bioativos atuam bem como pode-se realizar ensaios *in vivo* para identificação das propriedades biológicas.



Revista Química Nova

## **NORMAS DE PUBLICAÇÃO**

**GERAL** - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Artigos de Revisão** (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

**PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS** - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (\*) e



seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

## Referências

### **Revistas:**

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y.

I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

#### **Patentes:**

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; US pat. 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. Br PI 9.604.468-3, **1999**.

#### **Livros:**

##### com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

##### sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Wiley: New York, 1988.

#### **Programas de computação (Softwares):**

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

**Teses:**

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

**Material apresentado em Congressos:**

12. Ferreira, A. B.; Brito, S. L.; Resumos da 20<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, *Poços de Caldas, Brasil, 1998*.

**Páginas Internet:**

<http://www.sbgq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

**Material não publicado:**

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

**SUBMISSÃO DOS ARTIGOS** – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbgq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do

trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

**Material Suplementar** – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

**MANUSCRITOS REVISADOS** – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do

manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

**VERSÃO FINAL** – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr*, *eps*, *cdx* ou *opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.*

#### **Copyright ©2010 Sociedade Brasileira de Química**

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da

detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.



Volume 91, Number 1  
 March 2012  
 ISSN 0022-0304

### Guia de Autores: Journal of Dairy Science

#### Editorial Policies and Procedures

The American Dairy Science Association® (ADSA®) invites scientists from the global community to submit papers for consideration to the Journal of Dairy Science. Authors need not be members of ADSA. These instructions detail the form and style required by the Journal of Dairy Science (JDS) for papers submitted for publication. Papers that do not follow the form and style of the journal may be rejected without review. It is recommended that authors refer to these instructions when preparing manuscripts, when incorporating requested changes into revisions after review, and when checking author proofs.

#### Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Roger D. Shanks,  
 Department of Animal Sciences, University of Illinois,  
 308 Animal Science Lab, 1207 West Gregory Drive,

Urbana, IL 61801; phone: (217) 344-7512; e-mail:  
rdshanks@illinois.edu.

For assistance with Manuscript Central, Manuscript Submission/Copyright forms, and page charge/offprint orders contact Jennifer Gavel, Editorial Assistant, Headquarters Office, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; FAX (217) 378-4083; jennig@assochoq.org.

For other information or to submit a paper, contact Susan Pollock, Managing Editor, Headquarters Office, American Dairy Science Association, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; phone (217) 356-7641; FAX (217) 378-4083; journals@assochoq.org.

#### Care and Use of Animals

All research animals should be acquired, retained, and used in compliance with federal, state, and local laws and regulations. The authors should state explicitly that IACUC (or equivalent) approval was obtained before commencement of the study. Authors should make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments should be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd ed.

(available from Federation of Animal Science Societies, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820;

<http://www.fass.org/>). Methods of killing experimental animals must be described in the text. When describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified.

#### Types of Articles

Full-Length Research Papers. The majority of papers published in JDS are full-length research articles.



The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts and methods, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in the journal must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

In addition to full-length research papers, the following types of articles appear in the journal:

**Our Industry Today.** The Our Industry Today section includes interpretive applied summaries and recommendations from research that are useful to the dairy industry. Syntheses and applications from technical reports that contribute to solutions of problems in the dairy industry especially are solicited. Authors of reports for extension education of the nonscientist are encouraged to share their contributions with colleagues and to achieve larger circulation of their conclusions and recommendations through this section. In addition, papers that report on advances in teaching and outreach techniques are suitable for this section. The organization of papers for Our Industry Today may vary but should be logical and effective; an abstract is required. All other style and form instructions apply.

**Hot Topics.** Papers submitted for this section must report on a completed experiment testing a timely, original hypothesis of importance to an area of dairy science. The work may be preliminary in nature, but with sufficient data so that the hypothesis is clearly tested. Results may point to avenues for fruitful, indepth analyses. Reports must contain an explicitly stated hypothesis and objectives, with sufficient detail in methodology for repetition of the work, as well as a Journal of Dairy Science®

Revised December 2011.2 Journal of Dairy Science Instructions to Authors

Journal of Dairy Science 2012 results section, a brief discussion, and references. Total page limits for text, tables, figures, and references must be no more than 4 journal pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). The manuscript should contain a title and short abstract but not separate

sections. The total number of tables and figures should be no more than 3; references should be minimal. The first page must have HOT TOPICS in capital letters on the header line.

These papers will be given priority for publication.

An effort will be made to notify authors of a decision within 1 mo of the date of receipt. Once accepted, the paper should be published within 3 mo.

**Short Communications.** Short communications are reports of limited experiments that test a timely, original hypothesis of importance to some area of dairy science. The manuscript should be no more than 4 journal pages in length (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures); "Short communication:" should precede the title on the title page of the manuscript. Short communications should not contain main headings (e.g., Introduction, Materials and Methods) but may include subheadings for clarity.

The manuscript may report negative results. Reports must contain a hypothesis, objectives, sufficient detail in methodology for repetition of the work, results with brief discussion, and references.

**Technical Notes.** Papers in this section should report a method that is useful to some aspect of dairy science. Submissions should include a brief justification for the technique, be it new or an improvement on a previously published technique. The report should state a hypothesis, include a full description of procedures that can be repeated by researchers, and include

explicit controls to indicate sensitivity, precision, and accuracy of the technique. Technical notes should not contain main headings (e.g., Introduction, Materials and Methods) but may include subheadings for clarity.

If the technique is an improvement on an existing technique, sufficient comparison of the previous technique should be included, and mean and dispersion information must be included. The page limit is 4 printed pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). Use of tables, figures, and references should be minimized. Requests for

longer technical notes may be made to the senior editor and editor-in-chief, but justification for a longer report will be required.

**Invited Reviews.** The mechanism for consideration of invited reviews is to encourage additional publication (~10 to 12 per year) of invited reviews in all sections of the journal. Section editors will advise the editor-in-chief on suggested reviewers and

justification for the review. The editor-in-chief will make the invitation and the invited reviews editor will ensure the quality of the review. The first 10 printed pages of an invited review are published at no cost to the author.

Authors of symposium papers and invited papers presented at the joint annual meeting of ADSA/American Society of Animal Science may be selected to contribute invited review papers.

Letters to the Editor. Short (300 words) letters to the editor on topics of concern to readers, including comment on publications with rebuttals from authors if needed, may be submitted to the editor-in-chief or to any of the editors. The letters should be titled, and the title and running head should include "Letter to the editor." Letters will be published at the discretion of the editor-in-chief. Authors of letters are subject to the same copyright release requirements as other authors.

Letters are published at no charge to the author(s). Biographical Sketches. Occasionally, retiring or past scientists and educators should be subjects of biographical essays, both as a small honor to them and as an example and history for other readers. This section brings a sense of maturity and completeness to our field. Individuals who wish to submit biographical sketches should contact the editor-in-chief or one of the editors for additional instructions.

#### SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers online at Manuscript Central (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>).

Detailed instructions for submitting electronically are provided online (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>).

Authors who are unable to submit online should mail one copy of the manuscript and a disk with all manuscript materials (text, figures, and tables; preferably saved as a Microsoft Word file) to Jennifer Gavel, Editorial Assistant, American Dairy Science Association,

1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820. Staff at ADSA headquarters will post manuscripts by proxy, but authors who submit by mail should be aware that delays might occur in the review process.

Copyright Agreement

Data (including graphs, figures, tables, and illustrations) must not have appeared in print elsewhere except as abstracts, local or regional field day reports, extension letters, or non-peer-reviewed, noncopyrighted proceedings of conferences. Material submitted to JDS should not be submitted for publication to popular magazines, company advertisements, or organizational proceedings until the author has received notification of

acceptance of the manuscript. Before manuscripts are submitted, authors should have them read critically by others well versed in English to facilitate review, and  
Journal of Dairy Science 2012

Journal of Dairy Science Instructions to Authors 3 the senior author should have authorization to publish.

All coauthors should approve the manuscript before its submission to the journal.

The Manuscript Submission and Copyright Release form (published in issues of the journal and available from the journal web site: <http://www.journalofdairy.org>) should be submitted for each paper; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release Form; manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible

for obtaining the signatures of all coauthors. Authors who are not permitted to release copyright must still return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

Requests to reproduce material published in JDS must be made through Elsevier's Rights Department ([healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com)), online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>), or via the Copyright Clearance Center (<http://www.copyright.com>). The Association grants to the authors the right of republication of their own material in any book, thesis, or dissertation of which they are authors or editors subject only to giving proper credit in the book to the original JDS publication. In addition, authors may post abstracts of manuscripts on the web at the time of submission. Once an author receives notification of acceptance, the peer-reviewed, pre-typesetting manuscript can be posted to the author's website. Authors may deposit their peer-reviewed, pretypesetting manuscript into a repository upon payment of the open access fee (see page 4 of these instructions).

For more information, read the "Terms and Conditions"

pages at <http://www.journalofdairyscience.org/>.

## REVIEW OF MANUSCRIPTS

Upon submission to JDS, a manuscript is assigned to an editor, who enlists reviewers to assist in the evaluation of the manuscript. The review process is confidential, which infers a bond of trust among the authors, editor, and reviewers. The editor is trustee of the manuscript until the review process is completed and ensures that the review process is fair, thorough, and confidential. Reviewers are asked not to share the contents of the manuscript with anyone, except that they may ask a colleague to assist with the review with approval of the editor. Communication with authors should only be through the editor. Reviewers should notify the editor of conflicts of interest that may compromise their ability to provide a fair and unbiased review. Moreover, they must recognize their responsibility in maintaining the confidential nature of the review. Authors should suggest names of appropriate reviewers when submitting the manuscript to streamline the review process and may list reviewers whom they consider unacceptable because of potential bias.

These recommendations will be considered by the editor when assigning reviewers. Authors should read the statement on publication ethics, *Journal of Dairy Science* 68:3124.

A reviewed paper returned to authors for revision must be returned to the editor within 6 wk. If not, the paper may be treated as a new submission. Under unusual circumstances, editors may extend the revision deadline beyond 6 wk.



## Guia de Autores: Journal of Dairy Research

### General

The Journal of Dairy Research publishes reports in English on all aspects of dairy science from any country. Material for publication should be sent to the Editor, Dr David Chamberlain, Journal of Dairy Research, Hannah Research Park, Mauchline Road, Ayr, KA6 5HL, UK. Receipt of all material will be acknowledged by email. Submission of a paper will be taken to imply that it reports original unpublished work, that it is not under consideration elsewhere, and that if accepted by the Journal it will not be published elsewhere in any language without the consent of the editors. Authors should indicate that they accept the conditions in these Directions to Contributors. Authors of accepted articles will be asked to assign their copyright, under certain conditions, to the Journal to help protect their material.

### Submission of papers

Authors should submit the full paper in electronic form. An electronic version of the summary should be included as a Word file suitable for distribution to potential referees. Electronic submission may be on disc or as an e-mail attachment (jdr@hannahresearch.org.uk). The format should be as a Word document (for the PC not MAC). Authors of accepted papers are required to supply a copy of the final version as a Word document.

Submitted manuscripts must be concise and limited in length to a maximum of 6000 words, including an allowance of 250 words per fig or Table. This is approximately the equivalent of a Word document of 18 A4 pages of double-spaced 12pt Times New Roman font.

### **Layout of papers**

Papers should be presented with wide margins on one side of A4 or similar paper. Each page should be numbered in sequence, preferably with line numbering. Text should be double spaced throughout, including References, Figure Legends and Table headings and footnotes.

Papers should be written in English and should as far as possible be comprehensible to the non-specialist reader. They should be concise, but without omitting necessary material, and contain sufficient detail to allow repetition of the work. Spelling should be that of the Concise Oxford Dictionary, Oxford:

Clarendon Press. Exceptions will be indicated during technical editing. Do not hyphenate words at the end of a line unless a hyphen is to appear in the printed text.

Authors should consult a recent issue of the Journal of Dairy Research to familiarize themselves with Journal conventions and layout. Attention to these and other details will speed publication.

The paper should generally be divided as follows. (a) Cover sheet should give the title of the article, names of the authors each with one forename, together with their affiliations in any non-Cyrillic

European language, a shortened version of the title of not more than 45 letters and spaces suitable as a heading, and the name and address of the author to whom correspondence and proofs should be sent. (b)

A Summary, preferably not more than 300 words, should encapsulate the whole paper, showing clearly the new knowledge acquired. Individual results are rarely necessary. (c) The Introduction, which should not have a heading, should not contain a full review of the literature, but should help the non-specialist to understand why the subject of enquiry is interesting or important, and why the authors have

chosen the approach described. (d) The Materials and Methods section should contain adequate descriptions of procedures or appropriate references; sources of all materials (including address, with postal code) and sources or strains of animals and microorganisms should be indicated. (e) Results should be as concise as possible, without repetition or inclusion of irrelevant material. Tables and illustrations should be used efficiently. (f) The Discussion should not repeat the results but discuss their significance. Refer to existing or accepted knowledge in the present tense and the authors' work in the past tense; the difference in tense should clearly show the authors' contribution. A separate conclusion is not necessary but authors should summarize their main conclusions briefly. Acknowledgements of financial support, technical assistance and so on are given in a separate paragraph without heading. It is the responsibility of the authors to ensure that individuals or organizations acknowledged as providing materials or otherwise are willing to be identified. (g) References. For some types of paper, other divisions may be preferable.

### **Reviews of dairy science**

These are normally invited, but the editors are always interested to receive suggestions for topics, with or without possible authors.

### **References**

References should be given in the text as Brown & Jones (1987) or (Schmidt, 1985; Nakamura et al. 1989); the first author with et al. is used for papers with three or more authors. Where necessary, papers are distinguished as Lenoir (1988a), (Litov et al. 1990a, b). When several references appear together in the text, cite them in chronological order, and alphabetically within years. The Reference list at the end of the paper, which should begin on a fresh page, is given in strict alphabetical order. Each reference should contain authors' names, with initials (in capitals), the year, the title of the paper, the name of the journal in full, the volume and the page range. Titles of articles originally published in another language should be given in English translation, and this indicated by the use of square brackets. References to books should include the town of publication and the publisher, with editor(s) and volume and edition number where appropriate. Authors should refer to the most recent issue for the format of references. (Note that the Journal uses the minimum of punctuation.) Unpublished work should be given in the text (use authors' initials and surname) and not in the Reference list. Authors are reminded that they are responsible for checking references.

Units SI and metric units should be used whenever possible (see Quantities, Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences, 1971



London: The Royal Society and Specification for SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units, London: British

Standards Institution publication BS 5555). Note that cm, 100 g and 100 ml do not form the basis of SI units. However, for the present solutions should be given in terms of molarity (M) rather than mol/l, e.g. 0.5 M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Give compositions based on mass or volume as (e.g.) mg/l or mg/kg and not percentage.

Normality should not be used. Buffers should be given clearly, e.g. 30 mM-Tris--50mM-boric acid buffer, pH 8.

### **Microorganisms**

The organism should be described unambiguously, with genus, species and subspecies (if any) in italic and strain number or source in roman. Usage should conform to current international rules. Shortened forms or synonyms may be used after the first mention if desired. Chemical formulae These should be unambiguous. It is permissible but not required to use symbols for inorganic formulae.

### **Enzymes**

The recommendations of the International Union of Biochemistry (Enzyme nomenclature,1984, London: Academic Press) should be followed, and the EC number given where known.

### **Tables**

Tables should be numbered and carry headings enabling them to be understood without reference to the text. Any abbreviations should be defined. Each Table should be typed on a separate sheet and not included in the text, but their approximate position should be indicated by a marginal mark: e.g. Table 1 near here. Symbols for footnotes should be in the order, †, ‡, §, ¶, ††. The use of \*, \*\*, etc, should be limited to indicating levels of significance.

### **Illustrations**

Since June 2011, all colour figures submitted to Journal of Dairy Research will be published online free of charge on Cambridge Journals Online. Colour figures for the print version will result in a charge to the authors.

## How to Ensure Colour Online

To maximize the probability that figures will be published in colour online authors are encouraged to follow these figure submission guidelines:

- Submit a colour graphic as either TIFF or EPS files
- Submit figures at approximately the size at which they are to reproduce so that reduction or enlargement is not necessary.
- Line artwork should be supplied in black and white mode at a resolution of 1200 dpi;

combination artwork (line/tone) at a resolution of 800 dpi; black and white halftone artwork

should be saved in 'grayscale' mode at a resolution of 300dpi; colour halftone artwork should be saved in CMYK mode at a resolution of 300 dpi.

- Submit multipart figures in one single electronic file.

It is the responsibility of the author to ensure that any figures provided for colour online will reproduce well when converted to black and white for the print version.

Figures such as graphs must be supplied in an editable file format, such as Excel. The use of histograms and bar graphs should be restricted, as the information can often be better presented in a table. In the presentation of results, curves or lines should not extend beyond the experimental points, which should be indicated by symbols, used in order: ○, ●, □, ▲, ◻, ■, x, +. Scale marks should be on the inside of the axes. Each Figure should be provided with a legend such that with the Figure it is comprehensible without reference to the text. Figure legends should be typed on a separate sheet or sheets, beginning Fig. 1.

Halftone artwork should be accompanied by a legend as above. In case of size alteration in printing, scale bars on the photograph should be used, not magnifications in the legend.

Other nomenclature, symbols, abbreviations and conventions Authors should consult a current issue for guidance. Useful information on biochemical nomenclature and

permitted acronyms can be found in Biochemical Journal 169, 11-14 and on nutrient nomenclature in the British Journal of Nutrition. If authors use other abbreviations or acronyms, they should be defined at first mention, and their number restricted to ensure that the text is readable. Always use Arabic numerals with units; otherwise use words for 1-10 and figures for more than 10, (e.g. 3 weeks, three cows, 34 sheep) but avoid mixed lists. Time should be given by the 24 h clock, e.g. 14.15, without h or hours.

### **Statistical treatment**

Authors should, where possible, discuss their work with a statistician at an early stage and give attention to sample size. Individual results should not normally be given. The methods of statistical analysis should be clearly described; a suitable reference is adequate. Authors should make it clear whether they are quoting SED, SEM, SD, SE and so on. Any statement that two groups of values are different should be supported by the level of significance involved, as a single or range of Pvalue: ( $P=0.008$ ) or ( $P < 0.01$ ).

Differences should not be claimed or implied if  $P > 0.05$ .

### **Ethics of experiments**

Authors are expected to adhere to the relevant codes covering human subjects and the use of animals (British Medical Journal (1964) ii, 177-178; Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific

Investigations 1987 London: The Biological Council).

### **Revision of papers**

If a paper is returned to authors for possible amendment or revision, a period of 6 months will normally be allowed. The editors are ready to consider a revised or rewritten paper at any time, but after 6 months

it will be considered a new paper and given a new submission date.

### **Proofs**

Authors will be advised when to expect proofs, which should be returned without delay to the appropriate editor. Proofs are sent for the correction of any printer's or editorial errors, not for addition of new material or revision of the text. Excessive alteration may have to be disallowed or made at the authors' expense, and may delay publication. Order forms for paid offprints are sent with proofs and should be returned directly to Sue Perkins, Journals Production Department, Cambridge

University Press, The Edinburgh Building, Shaftesbury Road, Cambridge CB2 2RU,  
UK