

**TATIANA BARROS FERREIRA LIRA**

**AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O GRAU DE  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASEÍNA DO LEITE DE CABRA  
(*Capra hircus* Linnaeus, 1758) MOXOTÓ**

RECIFE-PE

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**TATIANA BARROS FERREIRA LIRA**

**AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O GRAU DE  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASEÍNA DO LEITE DE CABRA**  
*(Capra hircus* Linnaeus, 1758) **MOXOTÓ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto**

**Co-orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto**

RECIFE-PE

2010

Ficha catalográfica

L768a Lira, Tatiana Barros Ferreira  
Avaliação das variáveis que influenciam o grau de hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) Moxotó / Tatiana Barros Ferreira Lira. – 2010.  
76 f.: il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.  
Inclui referências e anexo.

1. *Capra hircus* 2. Leite caprino 3. Papaína 4. Pepsina  
5. Proteólise 6. Tripsina I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 636.39089

**Ao meu Deus, porque suas promessas não falham e por seu amor incondicional;**

**À minha avó Amara (*in memoriam*), pelo seu grande amor e por todos seus esforços para a minha vitória profissional e pessoal;**

**Ao meu marido, Saulo, por seu amor, sua dedicação e seu companherismo;**

**À minha mãe, Adilene, pelas suas orações e seu amor;**

**À minha tia, Anita, pelas suas orações e apoio;**

**Ao meu pai, Alcidézio, meu irmão Thiago e meu tio Arlindo, por me apoiarem e torcerem sempre por mim.**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela orientação, pela confiança em mim depositada e pela amizade construída;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto, pela co-orientação e dúvidas esclarecidas, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares pela sua contribuição e esclarecimentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, pela oportunidade;

Aos amigos e amigas do LIKA, que me ajudaram na realização do meu experimento, em especial Flávio Silva, Vilma Sobral, Giselle Dias, Milena, Germana Silva, Daniele Padilha, Roberto Afonso e Monique Ferraz.

Aos funcionários do LIKA, Rafael Padilha, Sr. Otaviano e Sr. Moisés, pelas contribuições fornecidas;

A Adelson Prado, por sua contribuição para realização do método Kjeldahl;

Ao Professor Alcides Sial, pelo empréstimo do botijão de nitrogênio líquido;

Às Professoras Dr<sup>as</sup>. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves e Keila Aparecida Moreira, pelo empréstimo das cubas e material para eletroforese;

Ao Sr. Marcelo Mota, proprietário da Fazenda Santa Marta localizada no Município de Sertânia-PE, por ceder o leite do seu animal para este experimento;

À cabra, pela sua amostra de leite, sem a qual este trabalho não seria realizado;

A Romero Brandão, por sua contribuição;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Simões, pela confiança e amizade;

Ao Sr. Samuel Barbosa Lira, pela ajuda na ida à Sertânia;

Ao funcionários do Departamento de Patologia da UFPE, Robson França e, em especial, Nadja Lopes, que apesar de todas as dificuldades, proporcionou todo auxílio necessário no meu local de trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Querino de Sousa, pela amizade e estímulo;

Aos membros da banca, pelas correções e contribuições;

A todos que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para a conclusão do meu Curso de Mestrado em Ciência Veterinária.

**Deus abençoe a todos e muito obrigada!**

Tatiana Barros Ferreira Lira

**“Porque para Deus nada é impossível”**

*Lucas 1:37*

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O GRAU DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASEÍNA DO LEITE DE CABRA (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) MOXOTÓ

O leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados. A caseína é o principal componente protéico do leite, constituindo aproximadamente 80% da fração total de proteínas do leite. O controle dos parâmetros hidrolíticos da caseína do leite é uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor. A caseína foi escolhida como fonte protéica na preparação de hidrolisados enzimáticos, obtida por precipitação isoelétrica e submetida à hidrólise enzimática usando-se tripsina, pepsina e papaína. O efeito do pH, temperatura, tempo e relação enzima: substrato sobre o grau de hidrólise foi avaliado de acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial completo ( $2^4$ ). A eletroforese em SDS-PAGE foi realizada para avaliação dos produtos de hidrólise. Os melhores valores de grau de hidrólise obtidos para as enzimas papaína, tripsina e pepsina foram 28,17%, 29,55% e 38,27%, respectivamente. Os resultados possibilitaram estabelecer as melhores condições de hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó, com as enzimas proteolíticas utilizadas, porém a pepsina apresentou melhor grau de hidrólise e foi possível detectar pela eletroforese SDS-PAGE apenas peptídeos com peso molecular abaixo de 14,4kDa.

**Palavras-chave:** *Capra hircus*, leite de cabra, papaína, pepsina, proteólise, tripsina.



## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE VARIABLES THAT INFLUENCE THE ENZYMATIC HYDROLYSIS DEGREE OF GOAT'S (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) MOXOTÓ MILK CASEIN

Goat's milk is the product derived from the complete milking, uninterrupted, in conditions of hygiene, goat healthy, well fed and rested. Casein is the major protein component of milk, constituting about 80% of the total fraction of milk proteins. The control of hydrolytic parameters of milk casein is an important step for obtaining products with high nutritional quality, desirable functional properties, organoleptic characteristics appropriate to the consumer. Casein is the first choice as a protein source in the preparation of protein hydrolysates, was obtained by isoelectric precipitation and enzymatic hydrolysis was performed using trypsin, pepsin and papain. The effect of pH, temperature, time and enzyme:substrate ratio on the hydrolysis degree was evaluated according to the results obtained in the factorial statistical design ( $2^4$ ). Electrophoresis in SDS-PAGE was performed to monitor the hydrolysis products. The best values of degree hydrolysis obtained for the enzymes papain, trypsin and pepsin were 28,17%, 29,55% and 38,27%, respectively. It was possible to establish the conditions for hydrolysis of goat's milk Moxotó casein using proteolytic enzymes, but the pepsin, showed the best hydrolysis degree and was detected by SDS-PAGE peptides just molecular weight below 14,4kDa.

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

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### TEXTO

- Figura 1** - Fluxograma de obtenção da caseína..... 20
- Figura 2** - Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídeos da  $\kappa$ -caseína, recobrando a superfície da micela..... 22

### ARTIGO

- Figura 1** - Gráfico de Pareto dos efeitos principais na hidrólise da caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó com papaína, tendo como variável-resposta o grau de hidrólise. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) pH - valor de pH, (2) Temperatura- temperatura da hidrólise, (3)Tempo - tempo de duração da hidrólise e (4) E:S - relação enzima:substrato..... 61
- Figura 2** - Gráfico de Pareto dos efeitos principais na hidrólise da caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó com tripsina, tendo como variável-resposta o grau de hidrólise. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) pH - valor de pH, (2) Temperatura- temperatura da hidrólise, (3) Tempo - tempo de duração da hidrólise e (4) E:S - relação enzima:substrato..... 62
- Figura 3** - Gráfico de Pareto dos efeitos principais na hidrólise da caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó com pepsina, tendo como variável-resposta o grau de hidrólise. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) pH - valor de pH, (2) Temperatura- temperatura da hidrólise, (3) Tempo - tempo de duração da hidrólise e (4) E:S - relação enzima:substrato..... 62

**Figura 4** - SDS-PAGE (Coloração por prata). Os números correspondem a: 1- hidrolisado com pepsina (ensaio 9); 2- hidrolisado com pepsina (ensaio 14); 3- hidrolisado com tripsina (ensaio 12); 4- hidrolisado com tripsina (ensaio 6); 5- hidrolisado com papaína (ensaio 13); 6- hidrolisado com papaína (ensaio 7); 7- caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó; 8- padrão de peso molecular..... 63

## LISTA DE TABELAS

### TEXTOS

<b>Tabela 1 -</b>	Classificação e divisão das proteases.....	25
-------------------	--	----

### ARTIGOS

<b>Tabela 1 -</b>	Resultados do planejamento fatorial $2^4$ para hidrólise da caseína do leite de cabra ( <i>Capra hircus</i> Linnaeus, 1758) da raça Moxotó utilizando a enzima papaína.....	58
<b>Tabela 2 -</b>	Resultados do planejamento fatorial $2^4$ para hidrólise da caseína do leite de cabra ( <i>Capra hircus</i> Linnaeus, 1758) da raça Moxotó utilizando a enzima tripsina.....	59
<b>Tabela 3 -</b>	Resultados do planejamento fatorial $2^4$ para hidrólise caseína do leite de cabra ( <i>Capra hircus</i> Linnaeus, 1758) da raça Moxotó utilizando a enzima pepsina.....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Raça Moxotó.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Leite de cabra.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Caseína.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Proteases.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Hidrolisados enzimáticos da caseína.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Fatores interferentes na hidrólise enzimática.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Grau de hidrólise.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação das variáveis que influenciam o grau de hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Guia de autores.....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o nono maior rebanho de caprinos do mundo do qual mais de 90% encontra-se na Região Nordeste (COSTA et al., 2008). As características do leite de cabra, tanto do ponto de vista nutricional quanto social, são importantes e motivam pesquisas para avaliação da produção e da composição nutricional deste produto (FERNANDES et al., 2008).

O fracionamento do leite gera uma série de produtos indicados para inúmeras aplicações, incluindo: soro ácido, caseínatos, co-precipitados protéicos de caseínas e soro, coágulo de caseína, soro doce, concentrado e isolados protéicos de soro e lactalbumina (KRÜGER, 2006).

Dentre as proteínas que constituem o leite, as caseínas representam cerca de 80% e as proteínas do soro representam 20% do total de proteínas do leite (OLALLA et al., 2009). Segundo Silva et al. (2007), o leite caprino possui cinco proteínas principais na sua constituição:  $\beta$ -lactoalbumina,  $\alpha$ -lactoalbumina, k-caseína,  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseínas.

As proteínas são componentes importantes dos alimentos, tanto pelo aspecto nutricional quanto pelo valor funcional. Os aminoácidos, essenciais ao funcionamento do organismo, são fornecidos pelas proteínas da dieta. Além disso, as proteínas possuem algumas funções específicas relativas à presença de peptídeos bioativos em sua sequência primária, o que as torna agentes promotores de saúde (LÉONIL et al., 2000).

É importante citar, a maior digestibilidade do leite de cabra em relação ao de vaca, justificando sua frequente utilização na alimentação de pessoas idosas, com problemas gástricos ou mesmo de crianças com problemas de alergia ao leite de vaca (ERIKSEN et al. 2008, CUI et al. 2009, OLALLA et al. 2009).

A proteólise, hidrólise enzimática de uma proteína, desempenha um papel importante em vários campos da biociência e biotecnologia, nos quais a proteólise é estudada em níveis qualitativos e quantitativos (VOROB'EV, 2009; CHICÓN et al., 2009).

Ressalta-se, o crescente interesse tecnológico pelos hidrolisados enzimáticos protéicos, uma vez que a hidrólise enzimática pode contribuir para a melhoria das propriedades funcionais das proteínas, pois os produtos lácteos são fontes ricas em proteínas, cálcio, vitaminas e compostos bioativos, podendo ser empregados para a elaboração de alimentos e ingredientes funcionais (LEÓNIL et al., 2000).

A discussão técnica sobre as formas de utilização do leite e derivados como alimentos funcionais deve ser estimulada e tecnologias precisam ser desenvolvidas e disponibilizadas para que o consumidor brasileiro venha a ser ainda mais beneficiado (COSTA e LIBERATO, 2003).

Estudos realizados por Guo et al. (2009), mostraram a importância de avaliar a temperatura, o pH, o tempo e a relação enzima-substrato (E:S) durante o processo de hidrólise enzimática. O controle desses parâmetros de hidrólise enzimática das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor (BIASUTTI et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura, pH, relação enzima:substrato (E:S) e tempo sobre o grau de hidrólise (GH) da caseína do leite de cabra Moxotó, bem como a utilização de diferentes enzimas proteolíticas para o processo de hidrólise enzimática da caseína, visando aplicações futuras dos hidrolisados provenientes da caseína do leite de cabras da raça Moxotó que podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos, tais como alimentos funcionais ou nutracêuticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Raça Moxotó

A raça Moxotó é uma raça nativa do Nordeste Brasileiro, rústica e adaptada à zona semi-árida desta região. A origem do nome “Moxotó” provém do vale do Rio Moxotó, no Estado de Pernambuco, onde se concentrava a raça. Na atualidade, é criada principalmente, nos Estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí (SANTOS et al., 2005). Nessa região, a criação de caprinos nativos da raça Moxotó e Sem Raça Definida (SRD), contribui para a sobrevivência da população que utiliza o leite e a carne destes animais (SILVA et al., 2007).

As raças caprinas nativas do Brasil originaram-se a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses e espanhóis. Após o século XIX, foram introduzidos caprinos exóticos melhorados substituindo as raças locais, provocando desgaste genético desse valioso material. A Região Nordeste detém um grande potencial para o desenvolvimento da pecuária através da caprinocultura, sendo estes elementos essenciais ao desenvolvimento rural (SILVA et al., 2007).

Dentre as raças nativas, a Moxotó apresenta características adaptativas que permitem a sobrevivência e a reprodução, principalmente no período de estiagem nas regiões semi-áridas, sendo portanto, um recurso genético valioso que precisa ser conservado e melhor caracterizado (OLIVEIRA, 2004).

A rusticidade dos animais da raça Moxotó bem como a facilidade de adaptação às condições ambientais contribuíram para tornar essa atividade relevante, nas pequenas e médias propriedades rurais. Entretanto, esta raça vem desaparecendo da região devido ao uso indiscriminado em cruzamentos com raças exóticas, notadamente a Anglo Nubiana, maior responsável pela diluição dos rebanhos nativos da região, com o objetivo de melhorar os índices produtivos dos rebanhos locais (OLIVEIRA, 2004; COSTA et al., 2008).



## 2.2 Leite de cabra

O leite é a fonte básica da alimentação, contendo proteínas, lipídios, minerais e lactose, além de fornecer todos os elementos necessários para o crescimento do neonato (MAGISTRELLI et al., 2008). O leite de ruminantes e seus derivados têm sido um elemento essencial na dieta humana desde o início da domesticação do gado (MICHAELIDOU, 2008). Nos últimos anos, o leite de mamíferos não-bovinos tem sido estudado para identificar o melhor substituto natural do leite humano (CRISCIONE et al., 2009).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 37 de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados.

A maior digestibilidade do leite de cabra levou a um aumento do interesse na utilização deste como alimento funcional, fazendo agora parte da atual tendência para uma alimentação saudável nos países desenvolvidos. Desta maneira, o maior consumo do leite de cabra pela população em geral pode ser recomendado devido às propriedades nutricionais benéficas do leite de cabra (elevada concentração de proteínas com alto valor nutritivo) e sua possível utilização por pessoas alérgicas ao leite de vaca (OLALLA et al., 2009).

O leite de cabra apresenta como característica peculiar, uma coloração branco-malte, contrariamente ao leite de vaca, devido à ausência de  $\beta$ -caroteno, razão pela qual a manteiga do leite de cabra é branca. O pH do leite de cabra oscila entre 6,5 e 6,7, no entanto, é importante estar atento ao fato de que o leite armazenado durante um determinado período de tempo, mesmo refrigerado, apresentar valores mais baixos de pH, devido ao desenvolvimento da acidez por ação microbiana (SANCHEZ, 2004).

O leite caprino também possui características peculiares de sabor, principal motivo da sua rejeição pelos consumidores, que resulta na imagem negativa de seus produtos. A formação de compostos voláteis que dão origem ao *flavour* do leite e dos seus produtos está relacionada à sua composição química (COSTA et al., 2008).

As principais diferenças existentes entre o leite de cabra e vaca podem ser sistematizadas como observa-se a seguir:

- A quantidade de ácidos graxos de cadeia curta são significativamente superiores em leite caprino do que os níveis encontrados em leite bovino (QUEIROGA et al., 2009; SHEEHAN et al., 2009). Diversas análises demonstram que o leite de cabra apresenta

18%, ou seja, o dobro do leite de vaca, de ácidos graxos de cadeia curta (de 4 a 10 carbonos) representados, sobretudo, pelos ácidos capríco (hexanóico), caprílico (octanóico) e cáprico (decanóico). Os ácidos citados são muito importantes no sabor e aroma típicos "*bouquet*" dos queijos de cabra (FURTADO et al., 1984);

- Os glóbulos de gordura são menores, cerca de 65% destes apresentam diâmetro inferior a 3 $\mu$ m, contra 43% no caso do leite de vaca, o que apresenta um interesse nutricional evidente, na medida em que ao se encontrarem mais dispersos no leite e apresentarem uma maior superfície específica para a atuação enzimática, são facilmente digeridos e assimilados (SANCHEZ, 2004). Furtado et al. (1984) afirmam que 28% dos glóbulos de gordura de leite de cabra, contra apenas 10% dos de leite de vaca, apresentam diâmetro igual ou inferior a 1,5 $\mu$ m, sendo notória também a diferença existente entre os tipos de ácidos graxos que compõem a gordura do leite de cabra e vaca.
- O leite de cabra não apresenta aglutinina, enzima que tem por função agrupar os glóbulos de gordura, o que explica a dificuldade do desnate espontâneo (SANCHEZ, 2004);
- A fração protéica dos leites de cabra e de vaca são quantitativamente muito semelhantes sendo, no entanto, o teor de caseína  $\alpha_{s1}$  um pouco superior no leite de cabra (SANCHEZ, 2004);
- A composição mineral do leite de cabra é similar à do leite de vaca, apresentando, no entanto, teores mais elevados de potássio, cloro e magnésio (SANCHEZ, 2004).

Às características intrínsecas do leite, sobretudo procedentes da especificidade da glândula mamária da espécie produtora, acrescentam-se algumas outras que, em regra, dependem do meio que envolve o animal produtor e do seu estado de saúde, são as de caráter microbiológico (SANCHEZ, 2004).

As proteínas do leite têm sempre grande interesse científico, devido à sua importância na nutrição humana e na sua fisiologia (MICHAELIDOU, 2008). Além das propriedades nutricionais, as proteínas do leite também conferem propriedades biológicas e tecnológicas ao leite. Quanto às propriedades biológicas, as proteínas do leite são potenciais ingredientes para alimentos funcionais ou promotores da saúde (PHELAN et al., 2009). No que diz respeito às propriedades tecnológicas, as proteínas do leite contribuem para propriedades físico-químicas e sensoriais dos derivados do leite ricos em proteínas, sendo que, quanto maior a quantidade de proteínas no leite cru, maior é o seu desempenho na transformação tecnológica necessária para preparar derivados, tais como leites fermentados ou queijos (OLALLA et al., 2009).

Maia et al. (2008) observaram ao realizarem estudos com animais das raças Moxotó, Canindé, Anglonubiana e SRD, que o teor de proteína foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) no leite das cabras Moxotó que nas demais raças estudadas, assim, estes autores consideraram esta raça promissora na produção de queijo. O conteúdo protéico do leite varia de acordo com as espécies e é influenciado pela raça, fase de aleitamento, alimentação, clima, paridade, estação do ano, estado sanitário do úbere e do animal (PARK et al., 2007; QUEIROGA et al., 2009).

No leite, dois grupos nitrogenados podem ser distintos: nitrogênio protéico e nitrogênio não-protéico, que representam cerca de 95% e 5%, respectivamente, do total de compostos nitrogenados no leite. O leite de cabra e de ovelha contém cerca de 0,7-1,0% e 0,4-0,8% de nitrogênio, respectivamente, dado de relevante importância em termos de tecnologia de laticínios e nutrição humana (PARK et al, 2007).

As proteínas do leite se apresentam em duas fases distintas. Uma delas é a fase micelar, composta de caseínas, como micelas suspensas, com cerca de 190nm de diâmetro em média. A outra é uma fase solúvel composta por proteínas do soro de leite (PARK et al, 2007; MICHAELIDOU, 2008).

### 2.3 Caseína

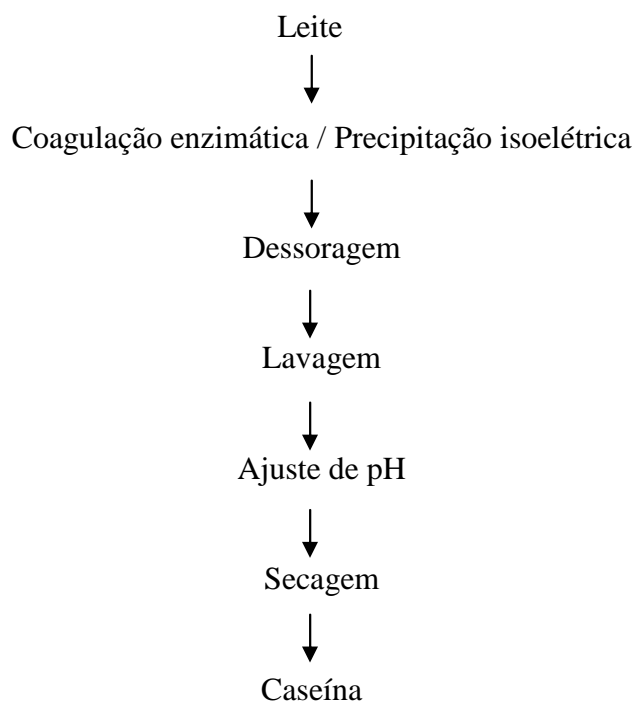
A caseína é o principal componente protéico do leite, constituindo aproximadamente 80% da fração total de proteínas do leite (LAMOTHE et al., 2007; MICHAELIDOU, 2008; OLALLA et al., 2009). As extensas pesquisas *in vitro* e em modelos animais têm sugerido que os peptídeos derivados da caseína não são apenas nutrientes, mas também uma fonte de peptídeos de baixo peso molecular com potencial atividade biológica (LAMOTHE et al., 2007). Esta proteína pode ser empregada em diferentes áreas, tais como: fabricação de queijo, fórmulas infantis, fabricação de revestimentos de papel, adesivos, tintas, cimento, têxteis e cosméticos (MIER et al., 2008).

A caseína se caracteriza pela sua precipitação quando o leite é acidificado a um pH de 4,6 e à temperatura de 20°C, sendo classificada como fosfoproteína, devido à presença de fósforo (SGARBIERI, 1996; OLIVEIRA e TIMM, 2007). A caseína tem característica anfipática por possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, porém a conformação das moléculas expõe consideravelmente os resíduos hidrofóbicos, o que resulta em forte associação entre suas frações e a torna insolúvel em água (OLIVEIRA e TIMM, 2007). Sua alta hidrofobicidade explica a propensão dos hidrolisados de caseína ao aparecimento de amargor (KRÜGER, 2006).

A caseína pode ser separada em várias frações eletroforéticas chamadas  $\alpha$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína, e  $\gamma$ -caseína. Estas frações de proteínas diferem na sua estrutura primária, secundária e terciária, além de seu peso molecular (GHOSH et al., 2009).

Existem dois processos de obtenção da caseína em escala industrial, precipitação isoelétrica e coagulação enzimática, que resultam respectivamente, na caseína ácida e caseína do coalho. A obtenção de caseína ácida é baseada na capacidade das proteínas precipitarem em seu ponto isoelétrico (pI). O pI é o valor de pH onde a carga líquida da proteína é zero, levando à formação de coágulos. No caso da caseína do coalho, o mecanismo é idêntico ao da produção de queijo e depende unicamente hidrólise da  $\kappa$ -caseína por proteases na ligação fenilalanina 105- metionina 106 (MIER et al., 2008).

A caseína ácida, geralmente é convertida para a forma de sal, o caseinato. Neste caso, um álcali (sódio, cálcio ou potássio) é adicionado ao produto, que então é desidratado. A caseína do coalho é utilizada principalmente na fabricação de queijos (KRÜGER, 2006). A figura 1 apresenta o esquema geral de obtenção da caseína.



**Figura 1-** Fluxograma de obtenção da caseína (Adaptado de Krüger, 2006).

Além do fornecimento de aminoácidos necessários ao crescimento do neonato, o sistema micelar das caseínas possui importância fisiológica, pois está relacionado à prevenção de uma calcificação patológica das glândulas mamárias. A inclusão de cálcio e fósforo nas micelas de caseína apresenta-se na forma de “nanoclusters”, permitindo a retenção e transporte desses importantes e pouco solúveis minerais ao recém-nascido sem o perigo da precipitação do cálcio nas glândulas mamárias (GEBHARDT et al., 2010).

O termo micela tem sido usado para designar a mistura complexa de proteínas dispersas do leite na forma de partículas coloidais aproximadamente esféricas. Cerca de 80-90% de toda caseína está nessa forma. A natureza e a estrutura das micelas de caseína têm sido extensivamente estudadas, mas sua exata estrutura ainda permanece em debate (KRÜGER, 2006; OLIVEIRA e TIMM, 2007).

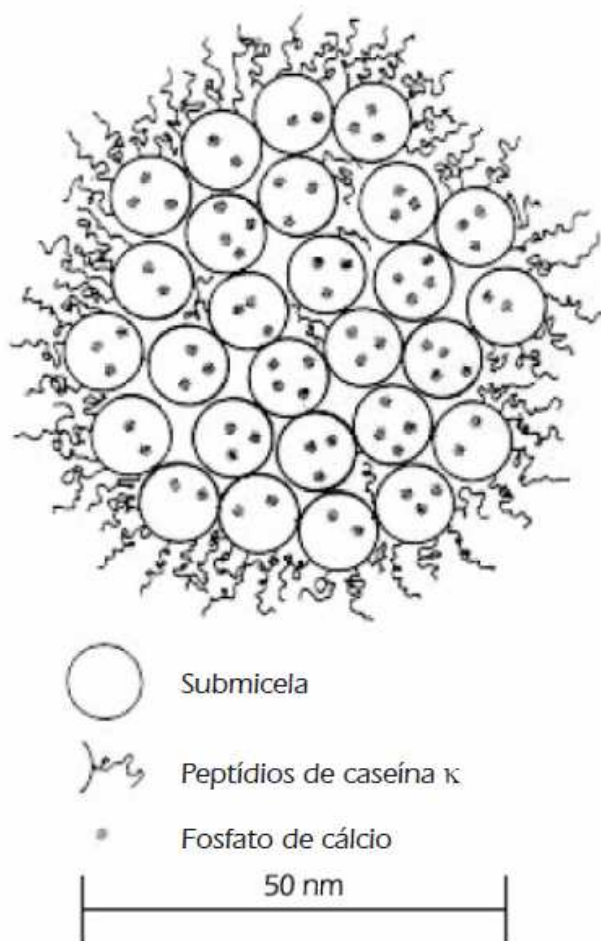
Durante várias décadas, uma variedade de modelos têm sido propostos para descrever a estrutura das micelas de caseína. Estes modelos são classificados em três categorias: modelos de núcleo, modelos de subunidade e modelos de estrutura interna. Os primeiros modelos de cada categoria foram propostos pela primeira vez na década de 1960, sendo que os modelos originais foram abandonados ou modificados acrescentando-se informações suplementares sobre as micelas de caseína que foram obtidas por pesquisadores posteriormente (PHADUNGATH, 2005).

O primeiro modelo de núcleo foi proposto por Waugh e Noble em 1965, o primeiro modelo de subunidade foi proposto por Morr em 1967 e o primeiro modelo de estrutura interna foi proposto por Rose em 1969. Versões mais recentes desses modelos foram propostas para o modelo de núcleo por Paquin e colaboradores em 1987, para o modelo de subunidade por Walstra em 1990, e para dois novos modelos de estrutura interna, com as caseínas agindo como inibidoras do aumento de precipitados de fosfato de cálcio por Holt em 1992 e depois em 1996 (PHADUNGATH, 2005).

O modelo mais comumente aceito está na categoria subunidade e foi proposto por Walstra em 1990. De acordo com Sgarbieri (2005), a estrutura da micela da caseína proposta por Walstra se apresenta da seguinte forma:

- a. A micela apresenta-se essencialmente esférica, contudo sua superfície não se apresenta lisa;
- b. A micela é formada de unidades menores denominadas submicelas, contendo principalmente caseína;
- c. As submicelas variam em composição, existindo dois tipos principais, isto é, um tipo formado pelas caseínas  $\alpha_s$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  e outro formado pelas caseínas  $\alpha_s$  e  $\kappa$ ;
- d. As submicelas parecem permanecer ligadas por aglomerados (*clusters*) de fosfato de cálcio;
- e. As submicelas se agregam até a formação completa da micela, em que a caseína  $\kappa$  se posiciona superficialmente;
- f. A porção C-terminal da caseína  $\kappa$  (glicopeptídeo) projeta-se para fora da superfície da micela, formando uma camada esponjosa que previne, por repulsões estéricas e eletrostáticas, qualquer agregação posterior de submicelas.

Na figura 2, observa-se uma micela em corte transversal, proposta por Walstra, mostrando a estrutura em sub-micelas, as cadeias polipeptídicas da  $\kappa$ -caseína se projetando da superfície e os aglomerados de fosfato de cálcio que servem como “cimento” para manter as submicelas ordenadas.



**Figura 2-** Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídeos da  $\kappa$ -caseína, recobrando a superfície da micela (SGARBIERI, 2005).

## 2.4 Proteases

Quimicamente as enzimas são proteínas, com algumas exceções, solúveis em água e álcool diluído, e quando em solução são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta, talvez, seja a propriedade mais importante desses compostos com relação à tecnologia de alimentos (KIELING, 2002).

Como o mecanismo celular dos sistemas vivos, animais, vegetais e microorganismos depende das enzimas, a fonte primária destas são tecidos animais (glândulas, principalmente), tecidos vegetais (sementes, frutas e exsudações) e culturas de microorganismos, quer se fazendo uso de cultivo total, quer extraindo as enzimas do meio de cultura de bactérias, fungos e leveduras (KIELING, 2002).

Assim, a maior parte das enzimas produzidas industrialmente tem aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais, principalmente alimentos, e na produção de derivados de matérias-primas vegetais e animais, pois em todos os casos de aplicação citados, se trata, fundamentalmente, de imitar tecnologicamente o que é feito na natureza, embora em escala condicionada à necessidade e vontade do homem (KIELING, 2002).

As enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e sub-classe 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases (GUADIX et al., 2000).

Aproximadamente 60% do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Nesta última, as proteases são utilizadas como adjuvantes no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, produtos lácteos, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (BIASUTTI, 2006).

Como fonte de enzimas, os vegetais têm sua limitação no fato de que relativamente pouca enzima pode ser extraída em relação a uma massa vegetal, havendo economia apenas na mão-de-obra e uso da terra, pois têm custo menor. São poucas as enzimas que podem ser obtidas economicamente nestas condições, entre elas, as proteases papaína, bromelina e ficina (KIELING, 2002).

A papaína (EC 3.4.22.2) é proveniente do mamoneiro, *Carica papaya* Linn., a partir do líquido leitoso do fruto verde ou do caule e das folhas. É muito empregada na indústria



alimentícia, cosmética e farmacêutica (FERREIRA et al., 2008), atuando na ligação cisteína 25- histidina 159 (LOPES, 2006).

As enzimas de glândulas e órgãos animais também têm produção limitada, porque são obtidas de subprodutos da industrialização de carnes, recurso alimentar pobre e, por isso, além de dispendiosos, de oferta geralmente escassa, tendo-se como exemplo o pâncreas bovino. São exemplos dessas enzimas a pepsina e tripsina (KIELING, 2002).

A pepsina (EC 3.4.23.1) cliva as ligações peptídicas das proteínas pelo lado aminoterminal dos resíduos de aminoácidos cíclicos aromáticos, rompendo as longas cadeias polipeptídicas em peptídeos menores. A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serinoprotease presente no intestino delgado onde atua na degradação de proteínas clivando de forma específica a ligação peptídica entre aminoácidos de arginina e de lisina na extremidade carboxílica (GONÇALVES, 2007; VISENTAINEL et al., 2007).

As enzimas microbianas, por sua vez, produzidas através do cultivo dirigido de microrganismos em substratos apropriados, não sofrem as limitações apontadas. Havendo a disponibilidade dos insumos do substrato ou meio de cultura, do agente microbiano mais apropriado, do método e condução do cultivo, a produção é potencialmente ilimitada, dependendo da economia do respectivo processo (KIELING, 2002).

De acordo com GUADIX et al. (2000), as proteases comerciais podem ser classificadas de acordo com a origem, o pH de atividade máxima, a ação catalítica e a natureza do sítio catalítico.

Quanto à ação catalítica, as proteases são classificadas em exopeptidases e endopeptidases (tabela 1). As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas, com base em seu sítio de ação, região N ou C-terminal, sendo classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C-terminal (ESPÓSITO, 2006).

As endoproteínases mais importantes são pepsina, secretada pelas glândulas gástricas como zimogênio, agindo no estômago em pH ácido, a tripsina e a quimiotripsina, ambas de origem pancreática sintetizadas como zimogênios, agindo no intestino em pH alcalino. Os zimogênios são enzimas inativas que são ativadas quando um segmento de sua cadeia proteica é removido, o que é feito por outras enzimas proteolíticas específicas ativas. As endopeptidases são sintetizadas e mantidas sob a forma inativa para evitar que exerçam atividade sobre as proteínas das membranas celulares e intracelulares do próprio organismo (VERGA-ORELLANA, 2003).

**Tabela 1-** Classificação e divisão das proteases

<b>Local de clivagem no substrato</b>	<b>Sítio ativo da enzima</b>	<b>Número de resíduos de aminoácidos removidos</b>
Exopeptidases	Aminopeptidases	Aminopeptidases
		Aminodipeptidases
		Aminotripeptidases
		<b>Sítio ativo da carboxipeptidase</b>
	Carboxipeptidases	Serinocarboxipeptidases
		Metalocarboxipeptidases
		Cisteínocarboxipeptidases
Endopeptidases	Serinoproteases	
	Aspartatoproteases	
	Cisteinoproteases	
	Metaloproteases	

**Fonte:** Espósito, 2006.

Para Biasutti (2006), quanto à natureza do sítio catalítico, as proteases são classificadas em:

- Proteases serínicas: possuem um resíduo de serina no sítio ativo;
- Proteases sulfidrílicas: possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo;
- Proteases metálicas: possuem em seu sítio ativo um íon metálico;
- Proteases ácidas: possuem pelo menos um grupo carboxila no sítio ativo.

## 2.5 Hidrolisados enzimáticos da caseína

As proteínas são uma importante fonte nutritiva de nitrogênio e de aminoácidos essenciais, no entanto, o consumo de proteínas intactas pode causar reações alérgicas em alguns indivíduos, desta maneira, os hidrolisados de proteínas podem ser utilizados extensamente na dieta desde que o seu valor nutricional seja preservado (LIU e GUO, 2008).

Após a ingestão, as proteínas são hidrolisadas no trato gastrintestinal por enzimas proteolíticas resultando na liberação de dipeptídeos, tripeptídeos e aminoácidos. Essas moléculas são eficientemente transportadas através da parede intestinal e servem para formação e manutenção das proteínas do corpo. Assim, os seres humanos estão continuamente expostos aos hidrolisados de proteínas do leite, sem sofrerem efeitos indesejáveis (DOORTEN et al., 2009).

Os hidrolisados de proteínas são descritos como uma mistura variável de polipeptídeos, oligopeptídeos e aminoácidos derivados de proteínas como a caseína, a qual tem sido a primeira escolha como fonte protéica no preparo de hidrolisados protéicos, entretanto, em países subdesenvolvidos, esta proteína muitas vezes é importada, o que representa um importante aumento nos custos de produção. Portanto, o uso de fontes alternativas deve ser investigado (BIASUTTI et al., 2008).

As proteínas podem ser modificadas intencionalmente por reações químicas, reações catalisadas por enzimas, transformações físicas ou alterações genéticas. Essas modificações podem ocorrer *in vitro* ou *in vivo*. Existem três formas diferentes de realização da hidrólise das proteínas: ácida, alcalina e enzimática (BUNKA et al., 2009).

A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, tais como: especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos. Além disso, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária. Vale ainda salientar que, na hidrólise enzimática há pouca probabilidade de ocorrer reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos, além de ser processada sob condições mais brandas (BIASUTTI, 2006). A principal desvantagem da hidrólise enzimática é a difícil recuperação da enzima após o uso, devido à dificuldade de separar o substrato do produto (FURLAN e OETTERER, 2002).

Desde 1940, os hidrolisados enzimáticos de proteínas vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a recuperação ou a manutenção do estado nutricional de pacientes com restrições protéicas ou de aminoácidos em sua dieta (SOARES et al., 2004). A produção industrial de hidrolisados de caseína, por sua vez, teve seu início a partir da década de 70. A matéria-prima mais frequentemente empregada tem sido o caseinato de sódio e, dependendo da aplicação, é selecionado o tipo de enzima proteolítica a ser usado. Muitas vezes, o hidrolisado é ultrafiltrado para eliminação de enzimas e de peptídeos de alto peso molecular (KRÜGER, 2006).

O valor nutricional dos hidrolisados depende da proteína de origem, do tipo de hidrólise (enzimática ou química) e do tamanho dos peptídeos formados na hidrólise. A qualidade de uma proteína alimentar se dá em função da natureza e de sua composição em aminoácidos, especialmente os essenciais (MORAIS et al., 2002; CARREIRA et al., 2003).

Ferreira et al. (2007) afirma que a hidrólise enzimática pode otimizar as propriedades funcionais das proteínas. Assim, a introdução na dieta de hidrolisados ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar melhor utilização das proteínas, principalmente em determinadas situações como a que ocorre em indivíduos com alergias a determinadas proteínas ou com intolerância alimentar, nos casos de deficiência enzimática (MORAIS et al., 2002; CARREIRA et al., 2003).

A caseína e seus hidrolisados enzimáticos possuem várias propriedades funcionais desejáveis e, por isso, há um grande interesse na sua utilização em maior escala na indústria de alimentos (BIASUTTI, 2006). No mercado europeu, os hidrolisados de caseína têm sido utilizados como parte integrante dos produtos lácteos fermentados e como fonte de proteínas em fórmulas infantis hipo-alérgicas por mais de uma década (DOORTEN et al., 2009).

O interesse pelos hidrolisados protéicos aumentou nos últimos anos, uma vez que foi mostrado que o tratamento enzimático contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, organolépticas e nutricionais das proteínas, atuando, particularmente, nas características de absorção protéica (BIASUTTI, 2006).

A maioria dos peptídeos derivados da caseína que apresentam atividade biológica é produzida *in vitro* pelo uso de proteinases pancreáticas, especialmente tripsina (KRÜGER, 2006; ROSSINI et al., 2009). Combinações com outras enzimas também podem ser utilizadas, incluindo quimiotripsina, pepsina, termolisina, pancreatina, carboxipeptidase, entre outras (GOBETTI et al., 2002).

A obtenção de peptídeos bioativos também pode ser feita através de culturas de microrganismos proteolíticos, por sucessivas combinações de hidrólise, por fermentação ou

por meio de síntese química (KORHONEN e PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2006; KRÜGER, 2006).

Além da especificidade e propriedades da enzima, existem outros parâmetros responsáveis pela trajetória da reação de hidrólise da proteína. Os parâmetros mais importantes na reação da hidrólise são: concentração de substrato (proteína), relação enzima:substrato, pH e temperatura (MOTA et al., 2006). O critério quantitativo da reação de proteólise é o grau de hidrólise definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao total de ligações peptídicas (BIASUTTI, 2006).

A utilização de hidrolisados protéicos, além de ser vantajosa do ponto de vista nutricional, é consideravelmente menos onerosa do que uma mistura de aminoácidos sintéticos. As misturas de aminoácidos livres têm pelo menos três limitações à sua utilização, a saber: o gosto e odor desagradáveis característicos de aminoácidos livres; a alta osmolaridade, o que acarreta um aumento da pressão osmótica intestinal causando diarreia; a absorção reduzida, uma vez que os aminoácidos livres não são tão rápida e completamente absorvidos pelo organismo quanto os hidrolisados protéicos (BIASUTTI, 2006).

Ainda de acordo com Biasutti (2006), as fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente de dipeptídeos e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, pois estudos do mecanismo de absorção intestinal verificaram que a velocidade de absorção de aminoácidos livres é menor que aquela dos pequenos peptídeos devido a alguns fatores como:

- competição entre aminoácidos com moléculas estruturalmente relacionadas pelo mesmo carreador. Assim, a absorção de alguns aminoácidos pode ser inibida por outros, como, por exemplo, o triptofano inibe a absorção de histidina e a leucina diminui a absorção de isoleucina, fenilalanina e triptofano;
- o transporte de aminoácidos é facilmente saturável, pois, depende de carreadores que são específicos para aminoácidos neutros, básicos e ácidos;
- enquanto os aminoácidos livres parecem ser mais rapidamente absorvidos apenas no intestino delgado proximal, os di e tripeptídeos o são tanto na porção proximal, quanto distal do intestino delgado.

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados em países desenvolvidos na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção e fenilcetonúria e ainda para pessoas com alergia a determinadas proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (FREITAS et al., 1993). Além disso, estes preparados

enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (BIASUTTI, 2006).

Em diversos estudos, o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de diferentes fontes protéicas (caseína, soro de leite e leite em pó) foi determinado a fim de se avaliar a composição em peptídeos e aminoácidos livres (BIASUTTI et al., 2008).

Após o processo de hidrólise por uma enzima específica, há necessidade da caracterização dos peptídeos obtidos. Vários métodos podem ser utilizados e incluem eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional ou bidimensional, focalização isoeletrica, imunoeletroforese, cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa (RP-HPLC), eletroforese capilar e espectrometria de massa do tipo MALDI- TOF (KRÜGER, 2006).

A avaliação da qualidade nutricional dos hidrolisados protéicos deve envolver a análise dos seus perfis peptídicos. Os hidrolisados de melhor qualidade devem apresentar elevados teores de dipeptídeos e tripeptídeos, assim como de peptídeos com massa molecular média de 500 Da. Além disso, devem conter baixos teores de aminoácidos livres e de peptídeos com massa molecular superior a 800 Da (SOARES et al., 2004).

A caracterização quantitativa e qualitativa da quebra enzimática das proteínas torna possível selecionar especificamente a modificação protéica desejável para a aplicação industrial da mesma (HILLER e LORENZEN, 2009).

A maior parte das investigações com relação ao estudo da hidrólise enzimática de proteínas se limita a encontrar as condições ótimas para realização do processo com vistas à produção industrial de hidrolisados, levando-se em consideração a complexidade da reação e sua importância econômica que determinam um maior interesse pelo desenvolvimento em escala comercial (GUADIX et al., 2000).

### 2.5.1 Fatores interferentes na hidrólise enzimática

Os principais fatores interferentes na hidrólise enzimática das proteínas, principalmente no que se refere à obtenção de peptídeos bioativos, são:

#### a. Natureza da enzima

Um fator crítico importante na produção de peptídeos bioativos é a escolha da enzima proteolítica uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos (COSTA et al., 2007). A hidrólise enzimática é uma alternativa atrativa para a modificação das proteínas devido a possibilidade de trabalhar em sistemas contínuos, e a relativa especificidade das enzimas, que pode ser utilizada para aumentar o controle da funcionalidade do produto final. Destaca-se ainda que, a ação individual de duas proteases produz hidrolisados com diferentes composições de peptídeos (BIASUTTI, 2006).

#### b. Tratamento térmico do substrato

A influência da temperatura na hidrólise enzimática pode ser observada em três etapas distintas: no pré-tratamento do substrato, durante a reação hidrolítica e na interrupção desta reação.

O pré-tratamento do substrato pelo calor pode influenciar no grau de hidrólise, devido à desnaturação protéica. Este procedimento provoca uma modificação da estrutura tridimensional da proteína, agindo sobre suas ligações fracas, as quais são responsáveis pela conformação nativa, aumentando a exposição das ligações peptídicas (estrutura primária) melhorando, assim, a acessibilidade do substrato às enzimas (CUI et al., 2009). Entretanto, é interessante ressaltar que o tratamento térmico dos substratos nem sempre apresenta efeitos benéficos sobre as reações enzimáticas. A desnaturação protéica provocada pelo calor poderá, por sua vez, influenciar o pH ótimo de algumas enzimas. A pepsina, por exemplo, apresenta atividade máxima a pH 2,0 ao atuar sobre a hemoglobina. Após este substrato protéico ter sido desnaturado por tratamento térmico, este valor passa para 3,5 (BIASUTTI, 2006).

Com relação ao efeito da temperatura durante a reação enzimática, sabe-se que cada enzima apresenta o seu valor ótimo de atuação, o qual é interpretado pela avaliação da curva de atividade *versus* temperatura, 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. O tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o crescente aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa. Deste modo, as reações de período curto podem ser realizadas a temperaturas mais elevadas do que às aquelas mais longas (BIASUTTI, 2006).

Como as enzimas são termolábeis, o calor de desnaturação resulta em uma perda gradual de suas propriedades catalíticas, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura. Então, se por um lado as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro, podem provocar a inativação da enzima, dependendo do calor aplicado. Esta ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada visando a interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80°C a 90°C, por 10 a 20 minutos. Sendo assim, valores muito elevados da temperatura de hidrólise devem ser evitados, para que não ocorra alterações na composição dos hidrolisados protéicos (BIASUTTI, 2006).

#### c. Relação enzima: substrato

A relação enzima: substrato (E:S) exerce influência na velocidade da reação e no tamanho dos peptídeos produzidos no final do processo de hidrólise (BIASUTTI, 2006).

#### d. pH utilizado

De acordo Kieling (2002), é importante destacar ainda a influência do pH na hidrólise enzimática, pois as enzimas possuem grupos químicos ionizáveis nas cadeias laterais de seus aminoácidos e segundo o pH do meio, estes grupos podem ter carga elétrica positiva, negativa ou neutra. Como a conformação das proteínas depende, em parte, de suas cargas elétricas, haverá um pH no qual a conformação será mais adequada para atividade catalítica. Este é o chamado pH ótimo. Desta forma o pH pode afetar de várias maneiras:

- O sítio ativo pode conter aminoácidos com grupos ionizados que podem variar com o pH;
- A ionização de aminoácidos que não estão no sítio ativo pode provocar modificações na conformação da enzima;



- O substrato pode ser afetado pelas variações do pH.

É importante destacar no que se refere à hidrólise enzimática da caseína, que segundo Oliveira e Timm (2007), o pH está entre os principais fatores que afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína.

## 2.6 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi definido segundo Adler-Nissen (1979) como o número de ligações peptídicas clivadas ou número de grupos amino livres formados durante o processo de hidrólise. O GH é calculado segundo a expressão:  $\text{GH (\%)} = h$  (número de ligações peptídicas clivadas) /  $H$  total (número total de ligações peptídicas) (ROMAN e SGARBIERI, 2005).

Para a determinação do GH das enzimas proteolíticas pode ser utilizada a metodologia adaptada de Pezoa e Salas-Mellado (1979). Nesta metodologia, o GH é expresso segundo a relação da quantidade de proteínas solúveis determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e a quantidade de proteínas totais presentes no substrato determinadas pelo método de Kjeldahl preconizado pela AOAC (2000) (MORAES et al., 2006).

O método Kjeldahl para determinação de nitrogênio Kjeldahl total tem sido utilizado desde 1883. Apresenta como principal vantagem o uso de uma aparelhagem simples e pouco onerosa. O método clássico Kjeldahl compreende duas etapas: (1) digestão da amostra para converter nitrogênio orgânico a íon amônio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) e (2) determinação do  $\text{N-NH}_4^+$  no digerido, após destilação com álcali. O sulfato de amônio resultante da digestão é aquecido com uma base, desprendendo amônia ( $\text{NH}_3$ ), e a reação pode ser representada pela equação:  $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$ . A amônia é então recolhida em uma solução ácida, e a espécie  $\text{N-NH}_4^+$  determinada por colorimetria, eletrodo íon seletivo ou titulação com solução padrão ácida (FERREIRA et al., 2004).

A porcentagem de nitrogênio é comumente usada para conversão em porcentagem de proteína multiplicando pelo fator 6,25 (16% de nitrogênio). Como a caseína contém mais que 16% de nitrogênio o fator de conversão deverá ser 6,38 e não 6,35 (SGARBIERI 1996; KRÜGER, 2006).

Uma das principais consequências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade e, normalmente este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise. Este aumento da solubilidade dos hidrolisados é, provavelmente, devido à diminuição do tamanho das moléculas e correspondente aumento da exposição de grupos hidrofílicos amino e carboxil ionizáveis. Porém, a hidrólise extensiva das ligações peptídicas da cadeia protéica causa mudanças na estrutura das proteínas e uma maior exposição de grupos hidrofóbicos (ROMAN e SGARBERI, 2005).

Os hidrolisados enzimáticos da caseína com um elevado GH podem conter alguns

peptídeos tanto com aminoácidos hidrofóbicos quanto hidrofílicos, alguns com mais aminoácidos hidrofóbicos e outros com mais aminoácidos hidrofílicos (LIU e GUO, 2008).

O conhecimento da relação entre o grau de hidrólise com alguma característica funcional específica do hidrolisado permite elaborar produtos com propriedades funcionais previamente definidas (CENTENARO e MELLADO, 2008).

Para Rossini et al. (2009), os hidrolisados protéicos podem ser classificados em três grandes grupos de acordo com seu GH, com determinadas aplicações:

- Hidrolisados com baixo GH com improvável propriedade nutricional;
- Hidrolisados com variável GH que podem ser usados como “*flavour*”;
- Hidrolisados com extenso GH que são muito usados como suplementos nutricionais e em dietas médicas especiais.

## REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 27, n. 6, 1979.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Gaithersburg MD, 2000.

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. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

BIASUTTI, E. A. R. et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 51-60, jan./mar., 2008.

BUNKA, F. et al. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, p. 224-232, 2009.

CARREIRA, R. L. et al. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: Emprego da pepsina. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.3, p.625-634, maio/jun., 2003.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **B. CEPPA**, Curitiba v. 26, n. 1, p. 61-70 jan./jun. 2008.

CHICÓN, R. et al. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, p. 593–599, 2009.

COSTA, E. L. et al. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, Great Britain, v 17, p. 632–640, 2007.

COSTA, N. M. B.; LIBERATO, S. C. Biotecnologia na nutrição e saúde. In: COSTA, N. M. B.; BORÉM, A. (Coord). **Biotecnologia e nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer a qualidade dos alimentos**. São Paulo: Nobel, 2003. cap. 2, p. 31-69.

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

CRISCIONE, A. et al. Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 19, p. 190-197, 2009.

CUI, C. et al. Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S.l.], v. 10, p. 37-41, 2009.

DOORTEN, A. Y. P. S.; WIEL, J. A. G.; JONKER, D. Safety evaluation of an IPP tripeptide-containing milk protein hydrolysate. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 47, p. 55-61, 2009.

ERIKSEN, E. K. et al. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 79, p. 29-37, 2008.

ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*colossoma macropomum*) e da carpa (*cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FERNANDES, M. F. et al. 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**, Viçosa, v.37, n.4, p.703-710, 2008.

FERREIRA, A. M. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de géis com diferentes concentrações de papaína. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 1035-1040, 2008.

FERREIRA, F. N. Determinação de nitrogênio total em amostras de rocha petrolífera pelo método Kjeldahl / indofenol. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Centro de Tecnologia Mineral, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004. 10 p.

FERREIRA, I. M. P. L. V. et al. Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 17, p. 481-487, 2007.

FREITAS, O. et al. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Whashington, v. 41, n. 8, p. 1432 - 1438, 1993.

FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico do pescado. **Revista de Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

FURTADO, M. M. **Fabricação de queijo de leite de cabra**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1984. p. 16-19.

GEBHARDT, R. et al. Structural changes of casein micelles in a rennin gradient film with simultaneous consideration of the film morphology. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 20, p. 203–211, 2010.

GHOSH, A.; ALL, M. A.; DIAS, G. J. Effect of Cross-Linking on Microstructure and Physical Performance of Casein Protein. **Biomacromolecules**, Washington, v. 10, p. 1681-1688, 2009.

GOBETTI, M. et al. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 42, n. 3, p. 223-239, 2002.

GONÇALVES, R. M. F. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito antinutricional de bebidas comuns.** 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ciência e Segurança Alimentar) - Universidade do Porto, Porto.

GUADIX, A. et al. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **ARS Pharmaceutica**, Granada, v. 41, n. 1; p. 79-89, 2000.

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*, London, v. 114, p. 328–333, 2009.

HILLER, B.; LORENZEN, P. C. Functional properties of milk proteins as affected by enzymatic oligomerisation. **Food Research International**, Barking, xxx (2009) xxx–xxx.

KIELING, D. D. **Enzimas: aspectos gerais.** Universidade Federal de Santa Catarina. Disciplina de Engenharia bioquímica. 2002, Florianópolis, 15 p.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 16, p. 945-960, 2006.

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

LAMOTHE, S. et al. Short Communication: Extraction of  $\beta$ -Casein from Goat Milk. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 5380-5382, 2007.

LÉONIL, J. et al. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1/2, p.1-21, 2000.

LOPES, J. L. S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Física Molecular). Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

LIU, Y.; GUO, R. Aggregation properties of aqueous casein hydrolysate solutions at different pH. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 18, p. 1022-1027, 2008.

MAIA, M. S. et al. Avaliação da composição do leite de cabras moxotó, canindé, SRD e anglonubiana criadas no semi-árido do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2008, Aracaju, **Anais...** Aracaju, 2008..

MAGISTRELLI, D.; DIMEL, G. P.; ROSI, F. Leptin, insulin and ghrelin levels in goat milk and in plasma of suckling kids. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 79, p. 38-41, 2008.

MAPA. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra**. [S.l.], 2000 (Instrução Normativa nº. 37 de 2000). Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em 24 ago. 2009. Publicada do DOU em 08 de novembro de 2000, Seção 1, p. 23.

MICHAELIDOU, A. M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 79, p. 42-50, 2008.



MIER, M. P.; IBÁÑEZ, R.; ORTIZ, I. Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.40, p. 304-311, 2008.

MORAES, K. S. et al. Grau de hidrólise e propriedades funcionais de hidrolisados de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir das enzimas Alcalase e Flavourzyme. IN: Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica, 21, 2006, FURG. **ANAIS...**, 2006.

MORAIS, H. A. et al. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados da caseína. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 52, n. 1, 2002.

MOTA, M. V. T. et al. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: Characterization using multivariate data analysis. **Food Chemistry**, London, v. 94, p. 278–286, 2006.

OLALLA, M. et al. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, London, v. 113, p. 835-838, 2009.

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

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.

PARK, Y. W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 88–113, 2007.

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**. FURG, Rio Grande, 1979.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **J. Sci. Technol.**, [S.I.],

v. 27, p. 201-212, 2005.

PHELAN, M. et al. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 19, p. 279-285, 2009.

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Physicochemical and sensory effects of cotton seed and sunflower oil supplementation on Moxotó goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, xxx (2009) xxx-xxx

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 25, p.468-474, jul./set, 2005.

ROSSINI, K. et al. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **Food Science and Technology**, [S.I.], v. 42, p. 862-867, 2009.

SANCHEZ, M. A. P. **Influência da matéria-prima no fabrico de queijo de cabra**. 2004. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Engenharia Alimentar). Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

SANTOS, F. C. B. et al. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do Nordeste Brasileiro. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 142-149, jan./fev, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Caseínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996, 516 p.

SGARBIERI, V. C. Effect of different hydrolyzates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. **Journal Medicinal Food**, Ames, v. 8, p. 337-342, 2005.

SHEEHAN, J. J. et al. Effect of partial or total substitution of bovine for caprine milk on the compositional, volatile, non-volatile and sensory characteristics of semi-hard cheeses. **International Dairy Journal**, Great Britain, p. 1-12, 2009.

SILVA, N. M. V. et al. Caracterização da esterase-D em caprinos da Raça Canindé. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, p. 467-471, 2007.

SOARES, R. D. L. et al. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 3, jul./set., 2004.

VERGA-ORELLANA, O M. **Larvicultura do dourado (*Salminus brasiliensis*): desenvolvimento ontogenético de proteínases digestórias e transição alimentar**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

VISENTAINEL, J.; NUNES, C S.; MORAES, G. Atividade proteolítica do suco digestivo em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: CONGRESSO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Mato Grosso do Sul. **Anais...** Mato Grosso do Sul, 2007.

VOROB'EV, M. M. Kinetics of peptide bond demasking in enzymatic hydrolysis of casein substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 58, p. 146-152, 2009.

**Artigo submetido ao Periódico Nacional Pesquisa Agropecuária Brasileira**

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > #8251 > **Resumo**

## #8251 Sumário

[RESUMO](#)   [AVALIAÇÃO](#)   [EDIÇÃO](#)

### Submissão

Autores	TATIANA BARROS FERREIRA LIRA, VILMA SOBRAL BEZERRA, FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA, GISELLE MARIA PEREIRA DIAS, JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO, TATIANA SOUZA PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO
Título	Avaliação das variáveis que influenciam o grau de hidrólise enzimática do leite de cabra Moxotó
Documento Original	<a href="#">8251-26628-1-SM.DOC</a> 2010-05-04
Doc. Sup.	<a href="#">8251-26629-1-SP.DOC</a> 2010-05-04 <a href="#">INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR</a>
Submetido por	BARROS FERREIRA LIRA
Data de submissão	May 4, 2010 - 08:08 PM
Seção	VETERINÁRIA
Editor	Nenhum(a) designado(a)

**Qualis da Capes- B1 para a Área de Medicina Veterinária**

# 1 **Avaliação das variáveis que influenciam o grau de hidrólise enzimática do leite de cabra**

## 2 **Moxotó**

3 Tatiana Barros Ferreira Lira<sup>(1)</sup>, Vilma Sobral Bezerra<sup>(1)</sup>, Flávio de Oliveira Silva<sup>(1)</sup>, Giselle

4 Maria Pereira Dias<sup>(2)</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>(1,2)</sup>, Tatiana Souza Porto<sup>(1)</sup> e Ana Lúcia

5 Figueiredo Porto<sup>(1,2)</sup>

6 <sup>(1)</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois

7 Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE. E-mail: taty.vet@gmail.com.br, villsb@yahoo.com.br,

8 foliveirasilva@gmail.com, joseluiz60@gmail.com, portots@yahoo.com.br,

9 analuporto@yahoo.com.br. <sup>(2)</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo,

10 s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE. E-mail: diasgmp@yahoo.com.

11  
12 **Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura, pH, relação

13 enzima:substrato e tempo sobre o grau de hidrólise da caseína do leite de cabra da raça

14 Moxotó, com a utilização de diferentes enzimas proteolíticas. A caseína foi obtida por

15 precipitação isoelétrica e submetida à hidrólise enzimática usando-se tripsina, pepsina e

16 papaína. O efeito das variáveis testadas sobre a hidrólise da caseína foi avaliado de acordo

17 com os resultados obtidos no planejamento fatorial completo (2<sup>4</sup>). A eletroforese em SDS-

18 PAGE foi realizada para avaliação dos produtos de hidrólise. Os melhores valores de grau de

19 hidrólise obtidos para as enzimas papaína, tripsina e pepsina foram 28,17%, 29,55% e

20 38,27%, respectivamente. Os resultados possibilitam estabelecer as melhores condições de

21 hidrólise da caseína do leite de cabra Moxotó, com as enzimas proteolíticas utilizadas, porém

22 a pepsina apresenta melhor grau de hidrólise, detectando-se pela eletroforese SDS-PAGE

23 apenas peptídeos com peso molecular abaixo de 14,4 kDa.

24  
25 **Termos para indexação:** *Capra hircus*, leite caprino, papaína, pepsina, proteólise, tripsina.



50 De acordo com a Instrução Normativa Nº. 37 de 2000 do Ministério da Agricultura,  
51 Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa,  
52 ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados  
53 e descansados.

54 As proteínas do leite têm grande interesse científico, devido à sua importância na  
55 nutrição humana e na sua fisiologia (MICHAELIDOU, 2008). Dentre as proteínas que  
56 constituem o leite, as caseínas representam cerca de 80% e as proteínas do soro representam  
57 20% do total de proteínas (OLALLA et al., 2009). Segundo Silva et al. (2007), o leite caprino  
58 possui cinco proteínas principais na sua constituição:  $\beta$ -lactoalbumina,  $\alpha$ -lactoalbumina, k-  
59 caseína,  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseínas.

60 A maior digestibilidade do leite de cabra levou a um aumento do interesse na utilização  
61 deste como alimento funcional, fazendo agora parte da atual tendência para uma alimentação  
62 saudável nos países desenvolvidos. Desta maneira, o maior consumo do leite de cabra pela  
63 população em geral pode ser recomendado devido às propriedades nutricionais benéficas do  
64 leite de cabra (elevada concentração de proteínas com alto valor nutritivo) e sua possível  
65 utilização por pessoas idosas, com problemas gástricos ou mesmo de crianças com problemas  
66 de alergia ao leite de vaca (CUI et al. 2009, OLALLA et al. 2009).

67 LEÓNIL et al. (2000) destacam o crescente interesse tecnológico pelos hidrolisados  
68 enzimáticos protéicos, uma vez que a hidrólise enzimática pode contribuir para a melhoria das  
69 propriedades funcionais das proteínas, e os produtos lácteos são fontes ricas em proteínas,  
70 cálcio, vitaminas e compostos bioativos, podendo ser empregados para a elaboração de  
71 alimentos e ingredientes funcionais.

72 O controle dos parâmetros de hidrólise enzimática das proteínas constitui uma etapa  
73 importante para se obter produtos com elevada qualidade nutricional, propriedades funcionais  
74 desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor (BIASUTTI et al.,

75 2008). Estudos realizados por Guo et al. (2009), mostraram a importância de avaliar a  
76 temperatura, o pH, o tempo e a relação enzima-substrato (E:S) durante o processo de hidrólise  
77 enzimática das proteínas do soro de leite.

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

81

## 82 **Material e Métodos**

83

84 A ordenha de um animal puro da raça Moxotó foi realizada de forma higiênica, como  
85 preconizada pela Instrução Normativa Nº. 37 de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária  
86 e Abastecimento (MAPA), sendo este animal proveniente do Município de Sertânia, Estado  
87 de Pernambuco, Brasil. As amostras de leite foram congeladas imediatamente após a coleta  
88 em nitrogênio líquido, e mantidas a -20°C. O protocolo da extração da caseína foi realizado  
89 segundo Egito et al. (2006), exceto pela retirada do tolueno. O precipitado da caseína foi  
90 solubilizado com 1M de NaOH até pH 7,0 e submetido à diálise contra água deionizada a 4°C  
91 por 96 horas. Após a liofilização da caseína, foram preparadas soluções contendo 2% de  
92 caseína em solução tampão fosfato 0,1M para hidrólise com papaína e tripsina, e em solução  
93 tampão HCl-KCl para hidrólise com a pepsina. O efeito das variáveis pH, temperatura, tempo  
94 e relação enzima: substrato (E:S) sobre o grau de hidrólise (GH) foi realizado de acordo com  
95 o planejamento fatorial completo ( $2^4$ ), segundo Bruns et al. (2006). Foram realizados 16  
96 ensaios e 4 repetições no ponto central. O mesmo planejamento foi realizado utilizando as  
97 enzimas tripsina (EC. 3.4.21.1), papaína (EC. 3.4.22.2) e pepsina (EC. 3.4.23.1), diferindo  
98 apenas quanto ao pH, o qual é específico para cada enzima. Os parâmetros utilizados na  
99 hidrólise foram: temperatura (40, 45 e 50°C), tempo de hidrólise (1, 3 e 5 horas) e relação E:S



100 (1:150, 1:125 e 1:100). O parâmetro pH utilizado na hidrólise da caseína foi diferente para  
101 cada enzima: papaína (6,5, 7,0 e 7,5), tripsina (7,5, 8,0 e 8,5) e pepsina (2,0, 2,5 e 3,0). As  
102 enzimas foram adquiridas da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). A seleção das  
103 variáveis e seus níveis foram determinados de acordo com a literatura. A análise estatística foi  
104 realizada com o auxílio do Programa Statistica 8.0 (STATSOFT INC, 2008). Após a  
105 hidrólise, as amostras foram submetidas à agitação por 30 segundos e colocadas em banho-  
106 maria com água a 90°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

107 Para a determinação do grau de hidrólise (GH) das enzimas proteolíticas utilizou-se a  
108 metodologia adaptada de Pezoa e Salas-Mellado (1979). As amostras foram centrifugadas a  
109 12.000xg durante 10 minutos. O GH foi expresso segundo a relação das quantidades de  
110 proteínas solúveis determinadas pelo método de Lowry et al. (1951) e de proteínas totais  
111 presentes no substrato (caseína) determinadas pelo método de Kjeldahl preconizado pela  
112 AOAC (2000).

113 Os hidrolisados da caseína foram analisados por eletroforese SDS-PAGE como descrito  
114 por Laemmli (1970), em gel a 15% de concentração e corados por Coomassie brilliant blue R-  
115 250 (GEORGE e DIWAN, 1983) e corante de prata (SWITZER et al., 1979). Nas corridas  
116 eletroforéticas, foram aplicados 3µL das amostras na concentração de 1µg/µL, com exceção  
117 da amostra de caseína, presente na linha 7, na qual foi aplicada 5µL na mesma concentração.  
118 Os marcadores de baixa massa molar (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) usados foram:  
119 fosforilase b (97kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30  
120 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

121

122

123

124

## Resultados e Discussão

125

126

### 127 Hidrólise enzimática da caseína caprina utilizando papaína

128 Os resultados obtidos na hidrólise da caseína caprina com a enzima papaína estão

129 apresentados na Tabela 1 e foram analisados estatisticamente como demonstrados na Figura 1.

130 O maior GH obtido utilizando a papaína foi 28,17% e as condições de hidrólise foram pH 6,5,

131 E:S 1:150, tempo de hidrólise de 5 horas e temperatura de 50°C.

132 O gráfico de Pareto representa os efeitos estimados das variáveis e das interações no grau

133 de hidrólise em ordem decrescente de magnitude (Figura 1). O comprimento de cada barra é

134 proporcional ao efeito padronizado. A linha vertical é usada para julgar quais os efeitos são

135 estatisticamente significantes. As barras que se estendem através desta linha correspondem

136 aos efeitos estatisticamente significantes com um nível de confiança de 95% (PORTO, 2004).

137 A única variável principal que apresentou efeito significativo foi relação a relação E:S,

138 sendo este negativo, ou seja, uma menor relação E:S (1:150) favoreceu o GH, nas condições

139 testadas. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Morais et al. (2002), os quais

140 apresentaram a influência da relação E:S sobre a hidrólise da caseína utilizando papaína, e

141 observaram que a alteração da relação E:S de 2% para 4%, alterou significativamente o

142 conteúdo de todas as frações cromatográficas, produzindo um perfil peptídico diferente, com

143 diminuição dos níveis de di e tri-peptídeos, assim como aumento do teor de aminoácidos

144 livres e médios peptídeos. O aumento da relação E:S deveria promover a quebra dos grandes e

145 médios peptídeos à di e tri-peptídeos, porém levou à clivagem destes a aminoácidos livres.

146 Também foi observada uma interação significativa entre pH, temperatura e tempo, na

147 qual a melhor condição para o GH da caseína caprina foi obtida na temperatura 50°C, pH 6,5

148 e tempo de hidrólise de 5 horas.

149 O trabalho realizado por Cavalli et al. (2008) mostrou que a digestão do caseinato de  
150 sódio do leite de cabra, hidrolisado com enzimas de extrato de flores *Silybum marianum*, a pH  
151 6,5 foi observada após 1 hora de digestão, porém tornou-se mais intensa com o decorrer do  
152 tempo de reação. Sendo a  $\beta$ -caseína caprina degradada em 40%, enquanto a  $\alpha_{s1}$ -caseína em  
153 68% após 24 horas de incubação. Os resultados do presente trabalho corroboram com os  
154 resultados encontrados por estes autores, onde foi o maior GH foi obtido utilizando o mesmo  
155 pH (6,5) em maior tempo de hidrólise.

156 No estudo realizado por Carreira et al. (2003), os autores recomendaram que a duração da  
157 reação hidrolítica não seja superior a 5 horas, porque este tempo pode favorecer a  
158 contaminação microbiana das preparações protéicas, além do que, na obtenção dos  
159 hidrolisados enzimáticos deve-se levar em consideração o custo-benefício para aplicação em  
160 escala industrial.

161

### 162 **Hidrólise enzimática da caseína caprina utilizando tripsina**

163 Os resultados do planejamento experimental da hidrólise da caseína caprina utilizando  
164 tripsina estão apresentados na Tabela 2. Observou-se que o maior valor de GH (29,55%) foi  
165 obtido a pH 8,5, com a relação E:S 1:150, durante 5 horas, à temperatura de 40°C (Tabela 2,  
166 ensaio 6). Estes resultados corroboram com obtidos por Qi et al. (2003), os quais mostraram  
167 que, ao utilizar a tripsina para hidrólise da caseína, o GH aumentou de 5% para 15% quando o  
168 tempo de hidrólise aumentou de 9 minutos para 1 hora e 30 minutos, utilizando a temperatura  
169 de 40°C, ou seja, o aumento do tempo favoreceu o GH. Porém, os resultados encontrados por  
170 Morato et al. (2000), mostraram que não houve vantagem na ação da tripsina sobre a hidrólise  
171 da caseína, quando o tempo de hidrólise foi aumentado de 2 horas e 30 minutos para 4 horas e  
172 55 minutos, pois não foi interessante para produção de pequenos peptídeos.

173 O único efeito significativo sobre o GH da caseína caprina, com nível de confiança de  
174 95%, foi a interação entre as variáveis pH e relação E:S, como pode ser observado na Figura  
175 2. Analisando-se esta interação, observou-se que a mesma apresentou efeito negativo sobre o  
176 GH, deste modo, quando o pH aumentou para 8,5 e a relação E:S diminuiu para 1:150  
177 favoreceu o GH. Schuchert-Shi et al. (2009), ao trabalharem com tripsina, observaram que  
178 uma alta concentração de tripsina não favoreceu a hidrólise das proteínas citocromo c e  
179 mioglobulina.

180

### 181 **Hidrólise enzimática da caseína caprina utilizando pepsina**

182 Os resultados obtidos com a hidrólise da caseína caprina pela enzima pepsina estão  
183 apresentados na Tabela 3. O maior valor de GH (38,27%) foi obtido nas condições relação  
184 E:S (1:100), pH 3,0, durante 5 horas de hidrólise, a 40°C.

185 Os resultados apresentados por Carreira et al. (2003), os quais utilizaram a pepsina na  
186 hidrólise da caseína, mostraram que o emprego da temperatura a 40°C apresentou vantagem  
187 para a hidrólise, pois provocou redução dos teores de grandes peptídeos. Os resultados  
188 observados por Guo et al. (2009), demonstraram que o melhor GH da caseína ocorreu quando  
189 uma maior quantidade de protease foi adicionada, uma vez que o GH aumentou de 3% para  
190 63% quando a relação E:S foi aumentada de 0,2 para 1,2 (% m/m). O trabalho realizado por  
191 Li et al. (2009), por sua vez, mostrou que quando a relação E:S aumentou de 0,1mL/100mL  
192 para 0,2mL/100mL, o GH aumentou de 27,7% para 43,1%. Os resultados encontrados no  
193 presente trabalho corroboram com estes três trabalhos citados, no que se refere à temperatura  
194 empregada e à relação E:S para o maior GH da caseína caprina obtido com a utilização da  
195 pepsina.

196 Os dois efeitos significativos, para a hidrólise da caseína caprina utilizando a pepsina,  
197 foram pH e tempo (Figura 3), ambos positivos, ou seja, o aumento nos níveis destas variáveis

198 favoreceu o GH. Nota-se, ainda, que os dois melhores resultados do GH da caseína caprina  
199 foram obtidos nas condições de pH 3,0 e durante 5 horas de hidrólise. Estes efeitos  
200 correspondem aos valores de GH de 38,27% e 37,53% (Tabela 3).

201

### 202 **Perfil eletroforético dos hidrolisados enzimáticos obtidos da caseína caprina**

203 O perfil da hidrólise foi avaliado por SDS-PAGE (Figura 4). Na linha 7 pode ser  
204 observada o perfil das frações  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína do leite de cabra da raça Moxotó. As frações  
205  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseína apresentaram massas molares superiores a 30kDa. Resultados semelhantes da  
206 migração eletroforética foram apresentados por Egito et al. (2006), os quais descrevem  
207 também a visualização de uma banda mais intensa da  $\beta$ -caseína no leite de cabra. A fração da  
208  $\beta$ -caseína corresponde a aproximadamente 60% da caseína caprina (TRUJILLO et al., 1997).

209 A eletroforese SDS-PAGE das amostras correspondentes ao menor e maior GH da  
210 caseína caprina com utilização da pepsina, tripsina e papaína estão representadas pelas linhas  
211 1 a 6 da Figura 4. As linhas 1 e 2 representam hidrolisados da caseína caprina com a pepsina  
212 que apresentaram GH correspondentes a 4,23% e 38,27% (ensaios 9 e 14 do planejamento 2<sup>4</sup>).  
213 As linhas 3 e 4, representam os hidrolisados da caseína caprina utilizando a tripsina,  
214 correspondendo aos GH 12,96% e 29,55% (ensaios 12 e 6 do planejamento 2<sup>4</sup>),  
215 respectivamente. As linhas 5 e 6, por sua vez, referem-se aos hidrolisados da caseína caprina  
216 obtidos pela papaína, com GH de 6,24% e 28,17% (ensaios 13 e 7 do planejamento 2<sup>4</sup>).

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

223 A hidrólise da caseína caprina com a pepsina levou a obtenção de hidrolisados apenas  
224 com massas molares inferiores a 14,4 kDa, demonstrando a eficiência desta enzima para  
225 hidrólise da  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína. Soares et al. (2004) relataram que os hidrolisados protéicos de  
226 melhor qualidade devem apresentar elevados teores de di-peptídeos e tri-peptídeos, assim  
227 como de peptídeos com massa molar média de 500 Da. Além disso, devem conter baixos  
228 teores de aminoácidos livres e de peptídeos com massa molar superior a 800 Da.

229 Ao analisar o perfil dos hidrolisados com menor e maior GH da caseína caprina obtidos  
230 com a utilização da tripsina observa-se que esta enzima não promoveu a clivagem completa  
231 da  $\beta$ -caseína, mas hidrolisou  $\alpha_{s1}$  e  $\kappa$ -caseína caprina. Contudo, a papaína hidrolisou  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -  
232 caseína caprina, porém não promoveu a clivagem completa da  $\kappa$ -caseína.

233

234

### Conclusões

235

- 236 1. Os resultados possibilitam estabelecer as melhores condições de hidrólise da caseína do  
237 leite de cabra Moxotó, com utilização das enzimas tripsina, papaína e pepsina.
- 238 2. O pH e o tempo de hidrólise são as variáveis que influenciam positivamente a hidrólise  
239 da caseína caprina pela pepsina, enquanto a interação entre o pH e a relação E:S  
240 apresentam efeito negativo sobre o GH quando utiliza-se a tripsina. Contudo, a interação  
241 entre o pH, temperatura e o tempo de hidrólise influencia negativamente o GH da caseína  
242 caprina pela papaína.
- 243 3. A enzima pepsina apresenta melhor grau de hidrólise, detectando-se pela eletroforese  
244 SDS-PAGE apenas peptídeos com massas molares abaixo de 14,4 kDa.

245

246

247

248

**Agradecimentos**

249

250 Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e à Faculdade São Miguel pelo apoio  
251 financeiro.

252

253

**Referências**

254 AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of**  
255 **Analysis**. 17 ed. Gaithersburg MD, 2000.

256 BIASUTTI, E. A. R.; AFONSO, W. O.; LOPES JUNIOR, C. O.; COELHO, J. V.; SILVA, V.  
257 D. M.; SILVESTRE, M. P. C. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de  
258 soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Revista Brasileira de Ciências**  
259 **Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 51-60, jan./mar. 2008.

260 BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. **Statistical Design-Chemometrics**, 1 rd ed.  
261 Elsevier, Amsterdam, 2006.

262 CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R. G.;  
263 SILVESTRE, M. P. C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos  
264 peptídeos: Emprego da pepsina. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n.3, p.625-634,  
265 maio/jun. 2003.

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

269 COSTA, R. G.; MESQUITA, I. V. U.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MEDEIROS, A. N.;  
270 CARVALHO, F. F. R.; BELTRÃO FILHO, E. M. Características químicas e sensoriais do  
271 leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de**  
272 **Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 4, p. 694-702, 2008.

- 273 CUI, C.; ZHOU, X.; ZHAO, M.; YANG, B. Effect of thermal treatment on the enzymatic  
274 hydrolysis of chicken proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**,  
275 [S.l.], v. 10, p. 37-41, 2009.
- 276 EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.;  
277 GAILLARD, J. L. Método eletroforético para detecção da adulteração do leite caprino com  
278 leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932-  
279 939, 2006.
- 280 FERNANDES, M. F.; QUEIROGA, R.C. R. E.; MEDEIROS, A. N.; COSTA, R. G.;  
281 BOMFIM, M. A. D.; BRAGA, A. A. Características físico-químicas e perfil lipídico do leite  
282 de cabras mestiças Moxotó alimentadas com dietas suplementadas com óleo de semente de  
283 algodão ou de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.4, p.703-710, 2008.
- 284 GEORGE V., DIWAN, A. M. Simultaneous staining of proteins during polyacrylamide gel  
285 electrophoresis in acidic gels by counter migration of Coomassie brilliant blue R-250. **Anal.**  
286 **Biochem.**, v. 132, p. 448–481, 1983.
- 287 GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the  
288 production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey  
289 protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 114, p. 328–333, 2009.
- 290 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of  
291 bacteriophage T4. **Nature**, [S.l.], v. 227, p. 680-685, 1970.
- 292 LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLE, D.; PEZENNEC, S.; BOUHALLAB, S. Application  
293 of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived  
294 peptides. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1/2, p.1-21, 2000.
- 295 LI, Z. Y.; YOURAVONG, W.; H-KITTIKUN, A. Protein hydrolysis by protease isolated  
296 from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases.  
297 **Food Science and Technology**, xxx, p. 1–7, 2009.



- 298 LOWRY, O. H. O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein  
299 measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v.  
300 193, p. 265, 1951.
- 301 MAPA. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra.**  
302 [S.l.], 2000 (Instrução Normativa nº. 37 de 2000). Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br).  
303 Acesso em 24 ago. 2009. Publicada do DOU em 08 de novembro de 2000, Seção 1, p. 23.
- 304 MICHAELIDOU, A. M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk  
305 products. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 79, p. 42-50, 2008.
- 306 MORAIS, H. A.; BARBOSA, M. S.; LOPES, D. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M.  
307 P. C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados da caseína.  
308 **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 52, n. 1, 2002.
- 309 MORATO, A. F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C.  
310 Optimization of Casein Hydrolysis for Obtaining High Contents of Small Peptides: Use of  
311 Subtilisin and Trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 843-857, 2000.
- 312 OLALLA, M.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; NAVARRO, M.; ARTACHO, R.; CABRERA, C.;  
313 GIMÉNEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat  
314 milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, London, v. 113, p.  
315 835-838, 2009.
- 316 PEZOA, V.; SALAS-MELLADO, M. M. Obtenção de um concentrado de proteínas de  
317 pescado para alimentos, pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado.  
318 FURG, Rio Grande, 1979.
- 319 PORTO, T. S. **Extração da pró-toxina Épsilon e de uma protease a partir de *Clostridium***  
320 ***perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas utilizando PEG/Citrato.** 2004, 93 f.  
321 Dissertação (Mestado em Tecnologia Químico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo,  
322 São Paulo.

- 323 QI, W.; HE, Z.; SHE, D. Product distribution of casein tryptic hydrolysis based on HPSEC  
324 analysis and molecular mechanism. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 767–775,  
325 2003.
- 326 SCHUCHERT-SHI, A.; HAUSER, P. C. Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins  
327 monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Analytical**  
328 **Biochemistry**, v. 387, p. 202–207, 2009.
- 329 SILVA, N. M. V.; RIBEIRO, M. N.; ROCHA, L. L, LARA, M. A. C.; GOMES FILHO, M.  
330 A.; SILVA, R.C.B. Caracterização da esterase-D em caprinos da Raça Canindé. **Archivos de**  
331 **Zootecnia**, Cordoba, v. 56, p. 467-471, 2007.
- 332 SOARES, R. L.; SILVA, V. D. M.; LOPES, D. C. F.; JUNQUEIRA, R. G.; FIGUEIREDO,  
333 A. F. S.; SILVESTRE, M. P. C. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó  
334 desnatado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.40,n.3,jul./set., 2004.
- 335 STATSOFT INC. **Statistica (data analysis software systems) version 8.0**. 2008
- 336 SWITZER, R. C.; MERRIL, C. R.; SHIFRIN, S. A. Highly sensitive silver stain for detecting  
337 proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 98, p. 231–237,  
338 1979.
- 339 TRUJILLO, A. J.; GUAMIS, B.; CARRETERO, C. Proteolysis of goat casein by calf rennet.  
340 **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 7, p. 579-588, 1997.
- 341
- 342
- 343
- 344
- 345
- 346
- 347

348 **Tabela 1.** Resultados do planejamento fatorial  $2^4$  para hidrólise da caseína do leite de cabra  
 349 (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó utilizando a enzima papaína.

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

350

351

352 **Tabela 2.** Resultados do planejamento estatístico 2<sup>4</sup> para hidrólise da caseína do leite de cabra  
 353 (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó utilizando a enzima tripsina.

354

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

355

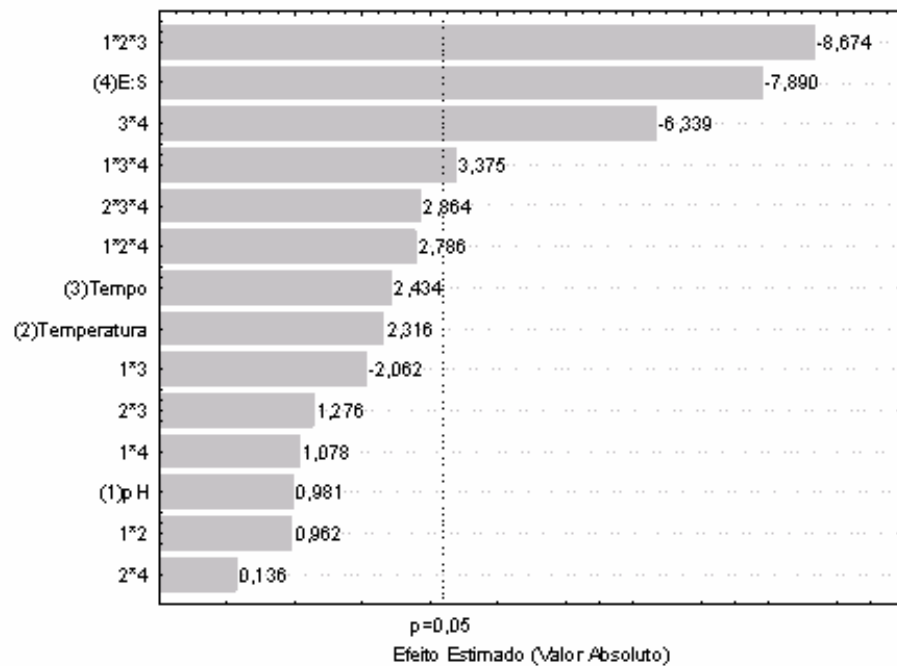
356 **Tabela 3.** Resultados do planejamento estatístico 2<sup>4</sup> para hidrólise da caseína do leite de cabra  
 357 (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó pela enzima pepsina.

358

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

359

360 **Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais na hidrólise da caseína do leite de cabra  
 361 (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó com papaína, tendo como variável-resposta o  
 362 grau de hidrólise. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) pH - valor de  
 363 pH, (2) Temperatura- temperatura da hidrólise, (3)Tempo - tempo de duração da hidrólise e  
 364 (4) E:S - relação enzima:substrato.



365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

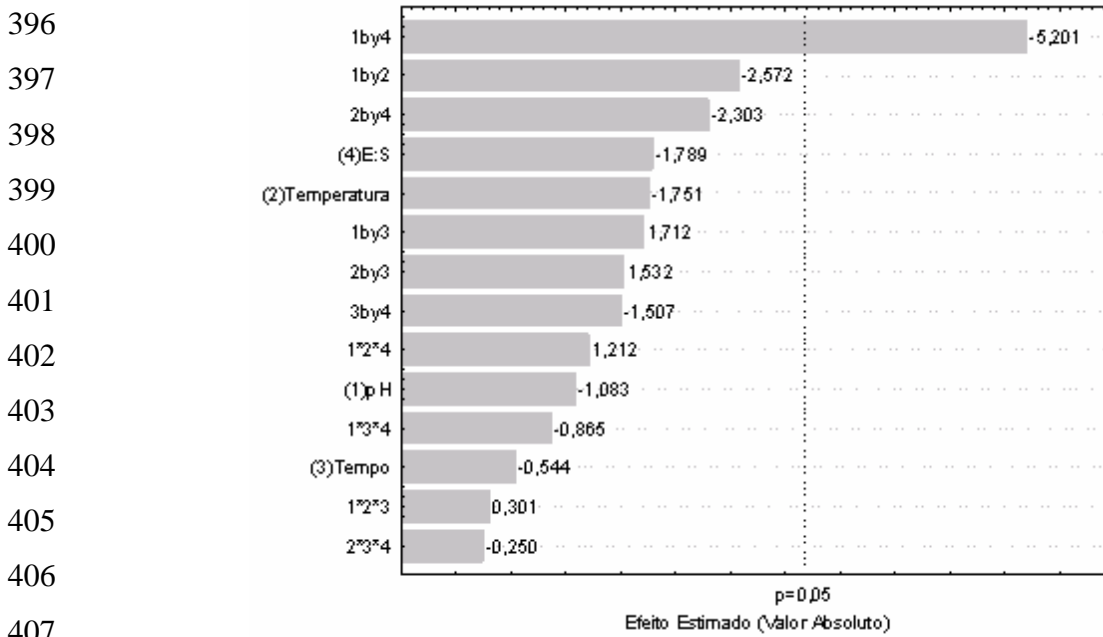
387

388

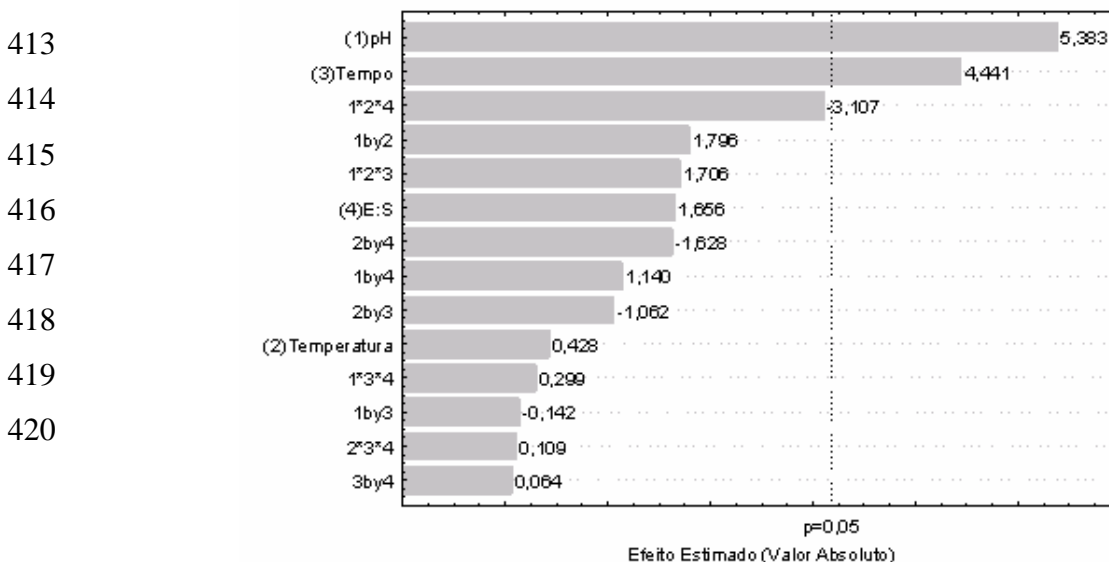
389

390

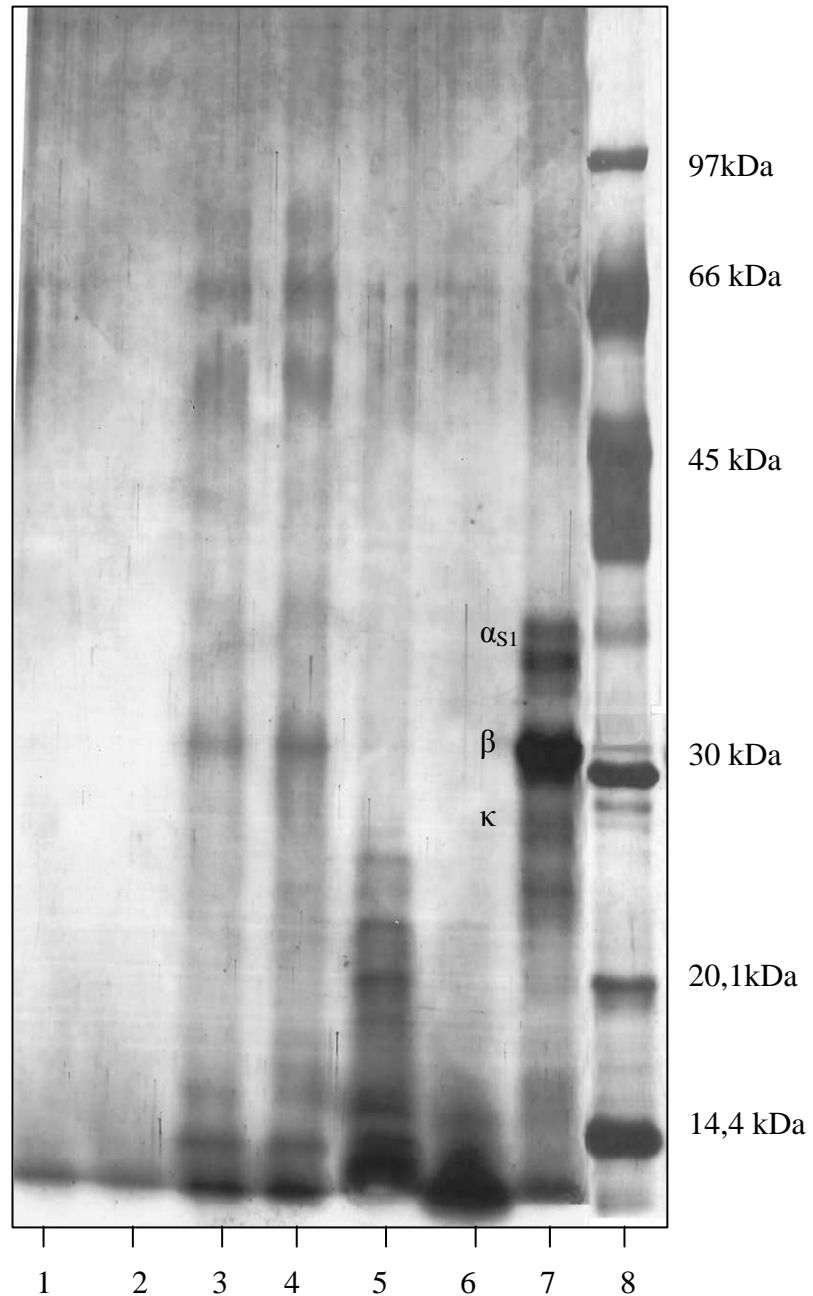
391 **Figura 2.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais na hidrólise da caseína do leite de cabra  
 392 (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó com tripsina, tendo como variável-resposta o  
 393 grau de hidrólise. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) pH - valor de  
 394 pH, (2) Temperatura- temperatura da hidrólise, (3)Tempo - tempo de duração da hidrólise e  
 395 (4) E:S - relação enzima:substrato.



408 **Figura 3.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais na hidrólise da caseína do leite de cabra  
 409 (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) da raça Moxotó com pepsina, tendo como variável-resposta o  
 410 grau de hidrólise. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) pH - valor de  
 411 pH, (2) Temperatura- temperatura da hidrólise, (3)Tempo - tempo de duração da hidrólise e  
 412 (4) E:S - relação enzima:substrato.



421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449



450 **Figura 4.** SDS-PAGE (Coloração por prata). Os números correspondem a: 1- hidrolisado com  
451 pepsina (ensaio 9); 2- hidrolisado com pepsina (ensaio 14); 3- hidrolisado com tripsina  
452 (ensaio 12); 4- hidrolisado com tripsina (ensaio 6); 5- hidrolisado com papaína (ensaio 13); 6-  
453 hidrolisado com papaína (ensaio 7); 7- caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus,  
454 1758) da raça Moxotó; 8- padrão de massa molar.



## ANEXO

### Guia de Autores

#### Escopo e política editorial

A revista **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas, Novas Cultivares e Revisões a convite do Editor.

#### Forma e preparação de manuscritos

##### Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

#### Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a

outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

### **Organização do Artigo Científico**

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

**Título**

Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.

Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

**Nomes dos autores**

Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

**Endereço dos autores**

São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

**Resumo**

O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.

Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### **Termos para indexação**

A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

Não devem conter palavras que componham o título.

Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ([http://www.fao.org/aims/ag\\_intro.htm](http://www.fao.org/aims/ag_intro.htm)) ou no Índice de Assuntos da base SciELO (<http://www.scielo.br>).

### **Introdução**

A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Deve ocupar, no máximo, duas páginas.

Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

### **Material e Métodos**

A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.

Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar

os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.

Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

### **Resultados e Discussão**

A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Deve ocupar quatro páginas, no máximo.

Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.

Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.

Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.

Dados não apresentados não podem ser discutidos.

Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.

Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.

As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.

Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.

Não podem consistir no resumo dos resultados.

Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.

Devem ser numeradas e no máximo cinco.

### **Agradecimentos**

A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).

Devem conter o motivo do agradecimento.

### **Referências**

A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.

Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.

Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.

Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.

Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.

Devem ser trinta, no máximo.

### ***Exemplos:***

*Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)*

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia

Florestal, 2004. p.153-162.

*Artigos de periódicos*

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

*Capítulos de livros*

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

*Livros*

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

*Teses*

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

*Fontes eletrônicas*

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: <<http://www.cpao.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>>. Acesso em: 18 abr. 2006.

**Citações**

Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

A autocitação deve ser evitada.

Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

***Redação das citações dentro de parênteses***

Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de

vírgula e ano de publicação.

Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.

Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

#### ***Redação das citações fora de parênteses***

Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

#### **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

#### **Tabelas**

As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.

Devem ser auto-explicativas.

Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser



claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo. Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

### ***Notas de rodapé das tabelas***

Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

## **Figuras**

São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

Devem ser auto-explicativas.

A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.

As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.

Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

Não usar negrito nas figuras.

As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser

gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

### **Notas Científicas**

Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

#### ***Apresentação de Notas Científicas***

A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

Resumo com 100 palavras, no máximo.

Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

### **Novas Cultivares**

Novas Cultivares são breves comunicações de cultivares que, depois de testadas e avaliadas pelo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), foram superiores às já utilizadas e serão incluídas na recomendação oficial.

#### ***Apresentação de Novas Cultivares***

Deve conter: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, título em inglês, Abstract, Introdução, Características da Cultivar, Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação de Novas Cultivares são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

Resumo com 100 palavras, no máximo.

Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

Deve apresentar, no máximo, 15 referências e quatro ilustrações (tabelas e figuras).

A introdução deve apresentar breve histórico do melhoramento da cultura, indicando as instituições envolvidas e as técnicas de cultivo desenvolvidas para superar determinado problema.

A expressão Características da Cultivar deve ser digitada em negrito, no centro da página.

Características da Cultivar deve conter os seguintes dados: características da planta, reação a doenças, produtividade de vagens e sementes, rendimento de grãos, classificação comercial, qualidade nutricional e qualidade industrial, sempre comparado com as cultivares testemunhas.

### **Outras informações**

Não há cobrança de taxa de publicação.

Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.

O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.

São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.

Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da **PAB**.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica

Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315

CEP 70770 901 Brasília, DF

### **Envio de manuscritos**

Os manuscritos devem ser submetidos conforme instruções contidas no endereço:

<http://www.sct.embrapa.br/seer>