



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS
DO QUEIJO DE COALHO FRESCO PRODUZIDOS NO
MUNICÍPIO DE CACHOEIRINHA - PE**

GISELLE MARIA PEREIRA DIAS

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GISELLE MARIA PEREIRA DIAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO QUEIJO DE COALHO
FRESCO PRODUZIDOS NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRINHA - PE**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. Ana Lúcia Figueiredo Porto

CO-ORIENTADORA: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

RECIFE

2010

GISELLE MARIA PEREIRA DIAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO QUEIJO DE COALHO
FRESCO PRODUZIDOS NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRINHA PERNAMBUCO - PE**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Pernambuco, como partes das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, para obtenção do
título de mestre.**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. Ana Lúcia Figueiredo Porto
CO-ORIENTADORA: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares**

RECIFE

2010

Dias, Giselle Maria Pereira

Avaliação do perfil dos peptídeos bioativos do queijo de coalho fresco produzidos no Município de Cachoeirinha - PE / Giselle Maria Pereira Dias. – Recife: O Autor, 2010.

53 folhas : fig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas 2. Peptídeos 3. Biomoléculas 4. Polímeros 5. Laticínios 6. Derivados do leite – Processamento – Cachoeirinha – PE I. Título.

572.65

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 071

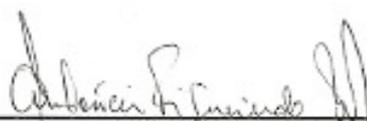
GISELLE MARIA PEREIRA DIAS

Avaliação do perfil dos peptídeos bioativos do queijo de coalho fresco produzidos no município de Cachoeirinha – PE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de mestre.

APROVADO EM: 24 de FEVEREIRO de 2010

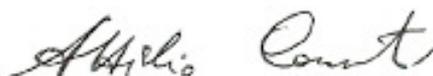
Orientadora:



Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Membros Titulares:



Prof. Dr. Attilio Converti

Dipartimento Di Ingegneria Chimica e Di Processo - Universita' Degli Studi Di Genova



Profa. Dra. Tatiana Souza Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

**“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”.**

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha vida.

Aos meus pais, irmão, amigos e familiares.

A minha orientadora e co-orientadora e a todos os professores e amigos que direta e indiretamente contribuíram na minha formação.

Obrigada.

RESUMO

O queijo de coalho é um dos principais produtos produzidos no Estado de Pernambuco a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o perfil dos peptídeos bioativos do queijo de coalho fresco produzidos no município de Cachoeirinha – PE. As amostras de queijo coalho foram coletadas em março e julho do ano de 2008 e transportadas para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami - LIKA/UFPE. Para a extração dos peptídeos solúveis, 40g da amostra dos queijos foram homogeneizadas com duas vezes do seu peso em água ultrapura, usando um misturador automático, em seguida foram centrifugadas 3 vezes a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após esse procedimento o sobrenadante final foi filtrado em papel de filtro, liofilizado e armazenado a -20°C. Os extratos dos peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha da primeira e segunda coleta foram submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) realizada no AKTA system – Amersham Pharmacia Biotech usando coluna de exclusão molecular tipo Superdex Peptide HR10/30 equilibrada com água ultrapura a fluxo de 0,2 mL/ min e coluna de troca iônica Mono Q HR 10/10 equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,0, a fluxo de 1,0mL/min. A fração catiônica foi eluída em tampão de equilíbrio, enquanto que a aniônica foi eluída no tampão de equilíbrio em gradiente de NaCl a 1M. O eluato protéico das cromatografias realizadas foi acompanhado por um detector UV a 260 e 280nm. O extrato de peptídeos solúveis do queijo coalho e o *pool* dos picos obtidos após as corridas cromatográficas em ambas as colunas, serviram como amostra para a avaliação do perfil eletroforético em SDS-PAGE. A massa dos peptídeos quando não visualizadas na eletroforese foi conhecida através da análise em espectro de massa do tipo MALDI-TOF, aparelho do tipo Autoflex III, de matriz de ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico em acetonitrila 33% e ácido trifluoroacético 0,1%, operada com modo de aquisição linear positivo. A atividade antimicrobiana dos extratos dos peptídeos solúveis e dos *pools* catiônicos obtidos após cromatografia de troca iônica foi testada frente à *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (bactéria gram-positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 (bactéria gram-negativa) e *Candida albicans* ATCC 50 - IBB (fungo) pela técnica de poço, disco-difusão e microdiluição para a determinação concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos após as análises cromatográficas realizadas em coluna de exclusão molecular mostraram perfil peptídico similar com a observação de picos eluídos no mesmo tempo de retenção enquanto que a cromatografia de troca iônica mostrou perfil similar apenas para a fração catiônica não apresentando similaridade para a fração aniônica. Perfil eletroforético similar também foi observado nos extratos dos peptídeos solúveis com 17 bandas para as duas coletas realizadas. O *pool* dos picos I obtidos por cromatografia de exclusão molecular apresentou 14 e 15 bandas, para 1° e 2° coleta, respectivamente. O *pool* pico II obtidos por cromatografia de exclusão não foram visualizados no gel de eletroforese, sendo suas massas moleculares conhecidas através de análises em espectro de massa. Essas análises evidenciaram a presença de 5 diferentes peptídeos. Inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi observada em todos os testes realizados, apresentando média de halos de inibição de 5,25 mm para a técnica de difusão em poço e 3,75 mm para a técnica de disco-difusão. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi sensível a ação do extrato dos peptídeos solúveis e a fração catiônica com concentração inibitória mínima de 9,37 mg/ mL e 6,22 µg/ mL, respectivamente. Enquanto que *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 foi sensível apenas ao *pool* da fração catiônica com concentração inibitória mínima de 199,37 µg/ mL.

Palavras-chaves: queijo de coalho, extrato dos peptídeos solúveis, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The “coalho” cheese is one of the main produced products in the Pernambuco State from raw cow’s milk and / or pasteurized milk. This study aimed to evaluate the profile of bioactive peptides artisanal farmhouse cheese produced in the Cachoeirinha city – PE, the cheeses samples were collected in March and July of 2008 and transported to the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA / UFPE. For the extraction of soluble peptides, 40g of the cheese sample were homogenized with twice its weight in water purification, using an automatic mixer, and then were centrifuged 3 times at 10,000 rpm for 20 minutes at 4 ° C. After this procedure the supernatant was filtered on filter paper, dried and stored at -20 ° C. Extracts of soluble peptides of cheese the first and second collection were submitted to High Performance Liquid Chromatography (HPLC) performed on the AKTA system – Amersham Pharmacia Biotech using molecular exclusion column type Superdex Peptide HR10/30 equilibrated with ultrapure water a flow of 0.2 mL / min and an ion exchange column Mono Q HR 10/10 equilibrated with Tris-HCl 25mM, pH 7.0, the flow of 1.0 mL / min. The cationic fraction was eluted in buffer equilibrium, while the anion was eluted in buffer equilibrium gradient to 1M NaCl. The protein eluate of the chromatography was performed followed by a UV detector at 260 and 280nm. The extract of soluble peptides from cheese and the peaks pool after the races on both chromatographic columns, served as a sample for evaluation of electrophoretic profile in SDS-PAGE. The mass of the peptides when not viewed on the electrophoresis was known through the analysis of mass spectral type of MALDI-TOF Autoflex III machine with matrix alpha-cyano 4-hydroxycinnamic in 33% acetonitrile and 0.1% TFA, operated acquisition mode with linear positive. The antimicrobial activity of extracts of soluble peptides and cationic pools obtained after ion-exchange chromatography was tested against Gram – positive: *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and Gram negative: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 by the technique well, disk diffusion and microdilution for determining minimum inhibitory concentration (MIC). The results obtained after GC analysis performed on a column of molecular exclusion profile showed similar peptide with the observation of peaks eluted at the same retention time, while the ion-exchange chromatography showed a profile similar to only a fraction cationic not showing similarity to the fraction anion. Similar electrophoretic profile was also observed in extracts of soluble peptides with 17 bands for the two collections. The pool of peak I obtained by molecular exclusion chromatography presented 14 and 15 bands for 1 and 2 of collection, respectively. The pool peak II obtained by exclusion chromatography were not seen in gel electrophoresis, and their molecular masses identified by analysis of mass spectrum. These tests revealed the presence of 5 different peptides. The growth inhibition of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was observed in all tests and averaged the inhibition of 5,25 mm for the technique well diffusion and 3,75 mm for the technique of disk diffusion. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was sensible the action of the extract of the soluble peptides and the cationic fraction with minimum inibitória concentration of 9,37 mg/mL e 6,22 µg/mL, respectively. Whereas, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 was sensible only to *pool* of the cationic fraction with minimum inibitória concentration of 199,37 µg/mL.

Key words: coalho cheese, extract of soluble peptides, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil cromatográfico dos extratos dos peptídeos solúveis dos queijos de coalho de Cachoeirinha - PE mediante eluição em coluna Superdex Peptide HR 10/30: (A) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da primeira coleta - março/2008; (B) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da segunda coleta - julho/ 2008. Coluna equilibrada com água ultrapura. Eluição das proteínas a fluxo de 0,2 mL/ min. Eluato protéico monitorado através de detector UV (ultravioleta) nas absorvâncias de 260 e 280nm. 50
- Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do extrato de peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha – PE e do *pool* dos picos obtido após cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide HR 10/30. O sistema foi carregado com um total de 10µg de proteína. Marcadores de alto e baixo peso moleculares foram usados como padrão. Na linha 1: padrão molecular de alto peso (220 – 53 KDa); Linha 2: extrato peptídico solúvel (1° coleta); Linha 3: Extrato peptídico solúvel (2°coleta); Linha 4: *Pool* dos Picos I (1°coleta); Linha 5: *Pool* dos Picos I (2° coleta); Linha 6: *Pool* dos Picos II (1° coleta); Linha 7: *Pool* dos Picos II (2° coleta); Linha 8: padrão molecular de baixo peso (97 – 14.4KDa). 51
- Figura 3.** Espectro de massa obtido pelo MALDI-TOF das frações referentes ao *pool* dos picos II obtidas por cromatografia de exclusão molecular do extrato peptídico solúvel da primeira coleta. Linhas que ligam picos em sequência e as letras (Q = glutamina, E = ácido glutâmico) correspondentes à diferença de massa de um peptídeo para outro. 52
- Figura 4.** Perfil cromatográfico dos extratos dos peptídeos solúveis dos queijos de coalho de Cachoeirinha - PE mediante eluição em coluna de troca iônica Mono Q HR 10/10: (A) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da primeira coleta - março/2008; (B) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da segunda coleta - julho/2008. Coluna equilibrada com 25mM de tampão Tris-HCl, pH 7,0. Proteínas catiônicas eluídas em tampão de equilíbrio e aniônicas eluídas no tampão de equilíbrio em gradiente de NaCl a 1M, ambos a fluxo de 1,0 ml/ min., sob baixa pressão e temperatura ambiente. O eluato protéico monitorado através de um detector de UV (ultravioleta) nas absorvâncias de 260 e 280nm. 52
- Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos extratos de peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha – PE e do *pool* dos picos catiônicos obtidos após cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 10/10. O sistema foi carregado 10µg de proteína. Marcadores moleculares de alto e baixo peso foram usados como padrão. Na Linha 1: padrão molecular de alto peso (220 – 53 KDa); Linha 2: extrato dos peptídeos solúveis (1° coleta); Linha 3: Extrato dos peptídeos solúveis (2°coleta); Linha 4: *Pool* dos picos catiônicos (1°coleta); Linha 5: *Pool* dos picos catiônicos (2° coleta); Linha 6: padrão molecular de baixo peso (97 – 14.4KDa). 53

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Peptídeos bioativos	13
2.1.1 Peptídeos antimicrobianos	14
2.1.2 Caseína com atividade antimicrobiana	16
2.2.2 Queijo	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo Geral	27
4.2 Objetivo Específico	27
	28
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO QUEIJO DE COALHO FRESCO PRODUZIDOS NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRINHA - PE	
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODO	33
2.1 Queijos	33
2.2 Extração dos peptídeos solúveis	33
2.3 Dosagem protéica	33
2.4 Cromatografia dos peptídeos solúveis do queijo	34
2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	35
2.6 Análise por Espectrometria de massa em MALDI-TOF	35
2.7 Atividade antimicrobiana	35
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	37
3.1 Análises do perfil cromatográfico e eletroforético dos extratos dos peptídeos solúveis, do <i>pool</i> dos picos obtidos por cromatografia de exclusão molecular e do <i>pool</i> dos picos catiônicos obtidos por cromatografia de troca iônica	37
3.2 Análise em espectro de massa MALDI-TOF da fração dos	41

peptídeos de peso molecular entre 100 e 7000Da obtidos da cromatografia de exclusão molecular	
3.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha - PE	42
4. CONCLUSÃO	43
AGRADECIMENTOS	44
REFERÊNCIAS	44
LEGENDAS DE FIGURAS	48
FIGURAS	50

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o último censo agropecuário do IBGE em 2006, Pernambuco possui 2.095,184 cabeças bovinas, distribuída entre rebanho de corte e leiteiro. O número de vacas ordenhadas no ano da pesquisa (2006) chegou a 463,147 cabeças, representando uma produtividade de 630,348 milhões de litros de leite. Deste volume, 462,030 milhões de litros são obtidos na Região Agreste do Estado dos quais 40% é destinada a produção de queijo (IBGE, 2006).

Em Pernambuco o queijo de coalho é um dos principais produtos manufaturados produzidos na Região Agreste adquirindo importância fundamental na economia dos pequenos municípios, uma vez que constitui a principal fonte de renda da propriedade familiar (NASSU et al., 2003). Sua origem está ligada à fabricação artesanal, em numerosas unidades de produção caseira e propriedades rurais de pequeno porte e/ou pequenas queijarias urbanas ou rurais (CAVALCANTI et al., 2007; FEITOSA, 2003).

Muitas substâncias biologicamente ativas têm sido encontradas em diferentes tipos de queijo. Essas substâncias são originadas devido à intensa proteólise realizada por ação de enzimas exógenas ou de bactérias ácido lácteas naturais durante a produção do queijo e do seu tempo de maturação (SAITO et al., 2000; RYHÄNEN; PIHLANTO-LEPPÄLÄ; PAHKALA, 2001; SMACCHI & GOBBETTI, 2000; SILVA & MALCATA, 2005). Essas proteínas dos alimentos com função biológica ou efeitos fisiológicos são chamadas de peptídeos bioativos. Possuem propriedades opióides, antitrombóticas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, antibacterianas, anti-gástricas, carreadora de minerais (SILVA & MALCATA, 2005).

A pesquisa por peptídeos bioativos em alimentos lácteos regionais, como o queijo de coalho, é importante uma vez que por ser um alimento funcional pode promover uma melhoria de saúde a população consumidora, além de permitir o desenvolvimento da região através da agregação de valor ao produto. Neste contexto, este projeto visa avaliar a presença de peptídeos bioativos no queijo de Coalho fresco produzidos no município de Cachoeirinha – Pernambuco localizado no Agreste de Pernambuco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos bioativos

Os peptídeos são moléculas produzidas por todos os seres vivos. São derivados a partir de proteínas, de origem bacteriana, vegetal e animal, compostas por sequência de aminoácidos que apresentam grande variedade estrutural e funcional apresentando atividades opióides, antitrombóticas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, antibacterianas, anti-gástricas, carreadora de minerais e diminuição do colesterol (SILVA & MALCATA, 2005).

Peptídeos com função biológica ou efeitos fisiológicos são chamados de peptídeos bioativos (SMACCHI & GOBBETTI, 2000). Esses peptídeos biologicamente ativos são sugeridos como co-adjuvantes na manutenção da boa saúde (GÓMEZ-RUIZ; RAMOS; RECIO, 2002).

Os peptídeos liberados a partir de proteínas alimentares durante a hidrólise ou fermentação, têm despertado interesse especial uma vez que podem influenciar em numerosas respostas fisiológicas no organismo além de poder ser ingeridos como componentes que ocorrem naturalmente nos alimentos (SMACCHI & GOBBETTI, 2000).

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

Alimentos funcionais apresentam atividade biológica a partir da liberação de peptídeos bioativos que estão inseridos dentro de sequências de aminoácidos presentes nas proteínas dos alimentos e liberados após a digestão enzimática (STANTON et al., 2005). Algumas bactérias em particular *Lactobacillus helveticus*, tem sido usadas para gerar peptídeos bioativos que exibem atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas e imunomoduladoras durante a fermentação do leite (SEPPO et al., 2003). Os peptídeos funcionais derivados das caseínas, presente no leite e produtos lácteos fermentados, tem mostrado efeitos no sistema cardiovascular, principalmente efeitos anti-trombótico e anti-hipertensivo (SILVA & MALCATA, 2005). Dois, tri-peptídeos derivados da caseína com potente atividade inibidora da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e efeito anti-hipertensivo *in vivo* foram isolados a

partir de leites fermentados com *Lactobacillus helveticus* e *Sacharomyces cerevisiae* (YAMAMOTO & TAKANO, 1999).

Diversos peptídeos bioativos também têm sido encontrados nos queijos. A presença destes peptídeos com atividade biológicas em queijos pode ser resultado da proteólise que ocorre durante o tempo de maturação (ADDEO et al., 1992).

Peptídeo anti-hipertensivo derivado de α_{S1} -caseína de queijo Parmigiano maturado por 6 meses foram isolados (ADDEO et al., 1992). Peptídeos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) foram isolados de diversos queijos italianos como, por exemplo, o Crescenza e o Gorgonzola que são caracterizados por curtos períodos de maturação (SMACCHI & GOBBETTI, 1998). Peptídeos com atividade imunomoduladora, também derivados da hidrólise da caseína como os caseinofosfopeptídeos, formados durante a maturação dos queijos devido à atividade da plasmina e de proteases bacterianas também foram obtidos durante a maturação de queijos cozidos como o Comté e o Grana Padano (ADDEO et al., 1992; ROUDOT-ALGARON et al., 1994; LAFFINEUR; GENETET; LEONIL, 1996; PELLEGRINO et al., 1997). Peptídeos derivados do queijo Slurry preparado usando *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, adicionadas como cultura iniciadora, teve efeito anti-carcinogênico (KORHNONEN, 2009).

Nesses casos, a identificação correspondente ao seqüenciamento de proteína, composição dos aminoácidos e análise estrutural dos peptídeos foram encontradas pela combinação de diferentes técnicas analíticas, como por exemplo, a espectrometria de massa (MS) (CARERI & MANGIA, 2003).

Peptídeos bioativos podem ser produzidos comercialmente e usados como produtos farmacêuticos, como por exemplo, nos alimentos ou como parte de um alimento que fornece benefícios médicos para manutenção da saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças (DE FELICE, 1995).

2.1.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos são moléculas capazes de desempenhar papel importante na primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de agentes patogênicos. Os mecanismos geralmente propostos, para a atividade desses peptídeos envolvem o dano da membrana celular

pela formação de poros ou por outros tipos de alteração em sua estrutura (AROURI; DATHE; BLUME, 2009).

O termo peptídeo catiônico é usado para descrever peptídeos antimicrobianos cujo gene codifica peptídeos inseridos em uma seqüência de 5 a 60 aminoácidos, com excesso de pelo menos duas cargas positivas devido à presença de resíduos de Lisina (L) e Arginina (Arg) ao redor de uma seqüência constituída, de pelo menos 50% de aminoácidos hidrofóbicos (HANCOCK & SCOTT, 2000).

A carga e hidrofobicidade dos aminoácidos constituintes dos peptídeos são fundamentais para a estrutura e atividade antimicrobiana destes compostos em solução. Estes compostos são estáveis em temperaturas elevadas (superiores a 100°C), e ativos quando acoplados a polímeros como óxido de polietileno e poliuretano. Existem ainda peptídeos antimicrobianos catiônicos que são ricos em aminoácido dotado de anéis de tioéter, que são lipopeptídicos (EPANDE & VOGEL, 1999).

Os peptídeos antimicrobianos apresentam uma grande variedade estrutural. Muitos peptídeos têm estrutura em α -hélice. A maior parte desses peptídeos são catiônicos e anfipáticos, mas há também peptídeos hidrofóbicos que apresentam atividade antimicrobiana. Alguns peptídeos em β -folha também têm atividade antimicrobiana e mesmo os peptídeos α -helicoidais quando modificados para possuir uma β -estrutura, retêm parte desta atividade (EPAND & VOGEL, 1999).

Apesar da diversidade estrutural, uma característica comum dos peptídeos antimicrobianos catiônicos é que todos têm uma estrutura anfipática que permite ligarem-se a membrana celular (HANCOCK & SCOTT, 2000). Certamente, a maioria dos peptídeos antimicrobianos catiônicos, interage com as membranas e por isso, recentemente, tem atraído muita atenção e passaram a ser vistos como solução capaz de driblar problemas de resistência bacteriana. Isto, devido a sua habilidade de alterar as membranas biológicas através de interações não específicas com os lipídios das membranas celulares (AROURI; DATHE; BLUME, 2009). Outra propriedade dos peptídeos antimicrobianos catiônicos é a capacidade de atravessar a membrana para alcançar um alvo dentro da célula bacteriana. Uma característica chave desses peptídeos é a capacidade de distinguir células bacterianas das células de mamíferos, baseado na composição diferente dos lipídios das membranas dessas células (AROURI; DATHE; BLUME, 2009).

A interação destes peptídeos com as membranas biológicas não é apenas uma função do peptídeo, mas é modulada igualmente pelos componentes de lipídios da membrana, sendo este

um mecanismo da ação importante para a maioria, se não todos os peptídeos antimicrobianos. Assim, os peptídeos antimicrobianos catiônicos exercem papel importante no sistema imunológico de animais e plantas, constituem as primeiras barreiras contra bactérias e fungos invasores, antes que o organismo elabore respostas mais específicas, por meio da produção de anticorpos e de células de defesa. São componentes importantes de defesa inata de todas as espécies de vida podendo ser, constitutivamente, expressados ou ser induzido por bactérias ou pelos seus produtos (HANCOCK & SCOTT, 2000).

Uma grande variedade de peptídeos tem sido reportada na literatura por apresentar atividades contra uma grande variedade de bactérias, incluindo isolados resistentes a antibióticos. Sabe-se que infecções bacterianas, especialmente quando tratadas com antibióticos, podem induzir à liberação de produtos bacterianos tais como o lipopolissacarídeos (LPS) e o ácido lipoteicóico (LTA), tendo por resultado infecção potencial letal conhecida como *sepsis* (HANCOCK & SCOTT, 2000; MILLER & KAPLAN, 2009).

Em contraste com os antibióticos, os peptídeos impedem, realmente, a indução da citocinas por produtos bacterianos quando presentes em cultura de tecido e sangue humano, além de obstruir o início do *sepsis*, pois matam muito rapidamente e não selecionam mutantes resistentes, são equivalentes a antibióticos convencionais e a lisozima, e por isso podem matar bactérias invasoras de células animais (MILLER & KAPLAN, 2009).

Entre as classes diferentes de peptídeos antimicrobianos, os peptídeos pequenos ricos em arginina e triptófano são os que apresentam grande interesse devido a sua potência e seletividade elevada, pelo seu pequeno tamanho e conseqüentemente, baixo custo (AROURI; DATHE; BLUME, 2009).

Um número cada vez mais elevado de publicações aponta os alimentos, em especial os lácteos, como principal fonte de peptídeos com inúmeras atividades biológicas. As propriedades funcionais e antimicrobianas das proteínas do leite, do soro e de seus derivados, tais como iogurte, queijo e caseína, têm atraído muita atenção devido a sua potente atividade antimicrobiana (HATMANN & MEISEL, 2007; MICHAELIDOU, 2008; NIELSEN et al., 2009).

2.1.2 Caseínas com atividade antimicrobiana

A caseína é uma das mais importantes proteínas presentes no leite, correspondendo a aproximadamente 80% do total protéico (SILVA & MALCATA, 2005). São sintetizadas pela glândula mamária em resposta a hormônios lactogênicos e são constituídas por frações α_{s1} , α_{s2} e β -caseínas que são envolvidas pela k -caseína formando o sistema micelar no leite. Quando a k -caseína é clivada proteoliticamente por ação enzimática da origem a para- k -caseína e a um macropeptídeo que não tem a propriedade de estabilizar a estrutura micelar e na presença do cálcio resulta na precipitação das proteínas do leite (VEGA-HERNÁNDEZ et al., 2004).

O papel da caseína no leite é amplamente aceito como sendo fonte de aminoácidos requeridos para o crescimento do neonato. Entretanto, a função fisiológica do sistema micelar da caseína está sendo mais bem estudada pelas atividades biológicas que tem apresentado em resultado de sua clivagem (SILVA & MALCATA, 2005).

Muitas substâncias biologicamente ativas estão presentes no leite, algumas dessas são completamente ativas como proteínas, enquanto outras estão latentes até que sejam liberadas no processo de proteólise. As atividades biológicas no leite incluem funções moduladoras gastrointestinais e digestivas, moduladores hemodinâmicos com efeitos potenciais no trato gastrointestinal, hormônios e fatores do crescimento (SMACCHI & GOBBETTI, 2000).

Caseínas e seus derivados são obtidos através da digestão mediada por quimosina, tais como caseidinas, isracidina e casosidina-1 que atuam sobre os lactobacilos e exercem uma forte ação protetora contra microrganismos patogênicos (SILVA & MALCATA, 2005). Caseidinas foi o primeiro peptídeos de defesa purificado a exibir atividade contra *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* (LAHOV & REGELSON, 1996). Há relatos também que a isracidina (fragmento α_{s1} -caseína) tem mecanismo de ação, *in vivo*, típica a atividade antibiótica, contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e que ainda podem proteger vacas e ovelha contra mastite (LAHOV & REGELSON, 1996). Estes imunopeptídeos, obtidos do fragmento α_{s1} -caseína e da α -lactalbumina estimulam a atividade fagocitária e também apresentam papel protetor contra infecções por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos (KRÜGER et al., 2006).

Além disso, fragmento catiônico da α_{s2} -caseína, conhecido como casosidina-1 também pode inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus carnosus*. Recio & Visser, 1999 identificaram dois peptídeos, obtidos do fragmento α_{s2} -caseína com atividade antibacteriana contra uma série de microrganismos. Efeito inibitório contra o crescimento de bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas mediado por *k*-caseína e lactoferrina também já foram referidos na literatura (SILVA & MALCATA, 2005; ENRIQUE et al., 2009).

Assim, os peptídeos antimicrobianos derivados da caseína podem apresentar um controle alternativo de populações de bactérias causadoras de patologias humanas e veterinárias.

2.2 Queijos

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, ou por enzimas específicas de bactérias específicas, ou pela ação de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade adequada para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

A produção do queijo é uma das mais antigas formas de emprego da biotecnologia tendo relatos do consumo do leite solidificado há 7.000 anos a.C. Contudo, foi durante o Império Romano que a produção do queijo aperfeiçoou-se alcançando um alto padrão tecnológico e de qualidade (GHISLENI, 2008). No século XIX iniciou-se a produção em massa de queijos, mas foi somente no início do século XX que foi aberta a primeira grande queijaria na França (PERRY, 2004). Atualmente, são produzidos e consumidos em todo o mundo milhões de toneladas de queijos de diversos tipos que são conhecidos como queijo fresco (Ricotta e Mascarpone), queijo macio (Havarti), queijo parmesão (Parmigiano-Reggiano), queijo “azul” (Roquefort e Gorgonzola); queijo duro (Gouda envelhecido), queijo de casca (Brie e Camembert) e as novas versões de queijo semi-macios (Manchego e Cheddar) que estão no mercado mundial enquanto que outros novos tipos estão sendo adicionados continuamente em consequência dos avanços tecnológicos na produção de queijo e de seu elevado valor nutricional (HENNING et al., 2006).

No Brasil o consumo *per capita* anual de queijos é de 2,3 Kg e este valor vem crescendo, mas ainda é pequeno quando comparado ao da Argentina e ao de países europeus. O estado de Minas Gerais é o maior produtor, com cerca de 200 toneladas por ano que responde

pela metade do consumo nacional. Em algumas regiões do estado, o setor queijeiro emprega cerca de 30 mil famílias de pequenos proprietários rurais e movimenta mensalmente algo em torno de 10 milhões de reais (PERRY, 2004; CICHOSCKI et al., 2002). Estes dados apontam a grande importância social e econômica que tem esse produto cuja renda alimenta milhares de famílias.

No mercado brasileiro, existem vários tipos de queijos frescos produzidos de forma artesanal e industrial, tanto por pequenos produtores quanto por algumas indústrias. São queijos muito populares e devido ao bom rendimento que proporcionam na fabricação, são comercializados a preço acessíveis a uma maior faixa da população (FERREIRA & FILHO, 2008).

Dados do censo de 2006 realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística revelaram que a produção leiteira tem crescido continuamente desde 1970, ultrapassando os 20 bilhões de litros em 2006 (IBGE, 2006). Em Pernambuco, os dados fornecidos pela Secretaria da Agricultura a partir do censo do IBGE apontam uma produção leiteira de 630,348 milhões de litros/ano com um crescimento de 76% na produção de leite nos últimos 10 anos (REVISTA FATOR BRASIL, 2006). O agreste pernambucano destaca-se, por ser responsável por 70% da produção total da bacia leiteira no Estado. Desse volume de leite, segundo alguns especialistas, 40% que corresponde a cerca de 1,8 milhões de litros por dia são destinados a fabricação de queijos (IPA, 2006).

Estima-se que a produção do queijo artesanal tipo coalho na Região Nordeste ocorra há mais de 150 anos. Trata-se de um produto popular, muito apreciado, e que faz parte da cultura regional. É produzido a partir do leite de vaca cru e/ou pasteurizado, entretanto, a maioria desses queijos tem a sua origem ligada a fabricação artesanal, em numerosas unidades de produção caseira e propriedades rurais de pequeno porte e/ ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais onde inexistem a padronização do seu processo de elaboração (CAVALCANTI et al., 2007).

De acordo com o Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade (BRASIL, 2001) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entende-se por queijo de coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação.

A enzima denominada quimosina corresponde a uma proteínase aspártica (EC 3.4.23.4) que atua clivando proteoliticamente a ligação peptídica fenilalanina¹⁰⁵-Metionina¹⁰⁶ da *k*-

caseína promovendo a formação do coágulo através da união entre a β -caseína e a α -caseína (VEGA-HERNÁNDEZ et al., 2004).

Durante a fabricação dos queijos ocorre a fermentação realizada pelas bactérias ácido-lácticas do leite que estão presentes como biótipos selecionados ou que são adicionadas como culturas iniciadoras aumentando a diversidade e o aroma presente nos queijos artesanais (MEYER-BROSETA et al., 2003; ABRIOUEL et al., 2008).

As propriedades organolépticas (aroma, sabor, flavor) particular dos queijos artesanais, produzidos com o leite cru estão associados com atributos do próprio leite, relacionado à raça, ao tipo de alimentação das vacas, ao processo de fabricação básico do queijo tradicional e a microbiota natural, responsáveis pela fermentação e maturação (BERESFORD et al., 2001; TOPISIROVIC et al., 2006). Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam a imensa variedade conhecida (PERRY, 2004).

Os queijos tem se destacado como os derivados lácteos mais consumidos, devido ao seu alto teor protéico que os tornam indispensáveis na alimentação humana (FERREIRA & FILHO, 2008). As proteínas do queijo não representam apenas componentes de valor nutritivo elevado, constituem fontes de peptídeos biologicamente ativos. Durante os últimos 20 anos, é crescente o número de trabalhos que estudam o leite e seus derivados, em especial o queijo, como fonte potencial de peptídeos bioativos os quais exibem inúmeras atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva, opióides e antitrombóticas benéficas a saúde (HAQUE & CHAND, 2008; SMACCHI & GOBBETTI, 1998; KORHONEM, 2009; GÓMEZ-RUIZ; RAMOS; RECIO, 2002; KRÜGER et. al., 2006).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H.; MARTÍN-PLATERO, A.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 200-208, 2008.

ADDEO, F.; CHIANESE, L.; SALZANO, A.; SACCHI, R.; CAPPUCCIO, U.; FERRANTI, P.; MALORNI, A. Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 59, p. 401-411, 1992.

AROURI, A.; DATHE, M.; BLUME, A. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: A mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2009.

BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. O Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Secretária Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília: DF, 11 mar, 1996. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 28 ago. 2009.

BRASIL, Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretária Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário oficial da União, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 28 ago. 2009.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

CARERI, M.; MANGIA, A. Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry. **Journal of chromatography A**. v. 1000, p. 609-635, 2003.

CAVALCANTI, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo de Coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas. v. 24, p. 205-214, 2007.

CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A. T.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M.; **Food Control**, v. 13, p. 329- 336, 2002.

DE FELICE, S. L. The nutritional revolution: its impact n food industry R & D. **Trends Food Science Technology**, v. 6, p.59-61, 1995.

ENRIQUE, M.; MANZANARES, P.; YUSTE, M.; MARTINEZ, M.; VALLE, S.; MARCOS, J.F. Selectivity and antimicrobial action of bovine lactoferrin derived peptides against wine lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, p. 1-7, 2009.

EPAND, R.M., VOGEL, H. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 11-28, 1999.

FEITOSA, T., BORGES, M. F., NASSU, R. T., AZEVEDO, E. H. F., MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FERREIRA, W.L.; FILHO, J. R. de F. Avaliação da qualidade físico-químicos do queijo Coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 02, n. 01, p. 127-133, 2008.

GHISLENI, C. P. **Influência da adição de probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*), fibra de trigo e gelatina nas características físico-químicas e sensoriais do queijo Prato durante a maturação**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 134p. 2008.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 697-706, 2002.

HANCOCK, R.E.W.; SCOTT, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Colloquium**, v. 97, p. 8856-8861, 2000.

HAQUE, E. & CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **Eur Food Res Technol**, v. 227, p. 7-15, 2008.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 63-169, 2007.

HENNING, D. R.; BAER, R. J.; HASSAN, A. N.; DAVE, R. Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fatbased spreads. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 1179-88, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>Acesso em: 06 out. 2008.

IPA. Instituto Agrônômico de Pernambuco. 2006. Disponível em: <<http://www.ipa.com.br>>Acesso em: 06 out. 2008.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.

KRÜGER, C. C. H.; SILVA, C. A.; VEDANA, M. I. S.; TIENE, C.; CÂNDIDO, L. M. B. Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.17, n. 1, p. 7-12, 2006.

LAFFINEUR, E.; GENETET, N.; LEONIL, J. Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 2112-2120. 1996.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substance from milk: Caseicidin, isracidin peptides. **Food and chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 131-145, 1996.

MEYER-BROSETA, S.; DIOT, A.; BASTIAN, S.; RIVIERE, J.; CERF, O. Impact of preheating on the behavior of *Listeria monocytogenes* in a broth that mimics Camembert cheese composition. **International Journal Food Microbiology**, v. 80, p. 1-15. 2003.

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

MILLER, L. G.; KAPLAN, S. L. *Staphylococcus aureus*: a community pathogen. **Infect Dis Clin N AM**, v. 23, p. 35-52, 2009.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. dos S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. de A. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza, CE. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Agroindústria Tropical, n. 11, p. 24, 2003. Disponível em: http://www.cnpq.br/publica/pub/BolPesq/bd_11.pdf. Acesso em: 28 ago 2009.

NIELSEN, M.S.; MARTINUSSEN, T.; FLAMBARD, B.; SØRENSEN, K.; OTTE, J. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 155-165. 2009.

PELLEGRINO, L.; BATTELLI, G.; RESMINI, P.; FERRANTI, P.; BARONE, F.; ADDEO, F. **Alkaline phosphatase inactivation during Grana Padano cheese-making and related effects on cheese characterization and ripening**. *Lait*, v. 77, p. 217-220, 1997.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

RECIO, I.; VISSER, S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, n. 2/3, p. 314-326, 1999.

REVISTA FATOR BRASIL. 2006. Disponível em: <<http://www.revistafatorbrasil.com.br>> Acesso em: 06 out. 2006.

ROUDOT-ALGARON, F.; LE BARS, D.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; GRIPON, J. C. Phosphopeptides from Contém cheese: nature and origin. **Journal Food Science**, v. 59, p. 544-547. 1994.

RYHÄNEN, E. -L., PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 441-447, 2001.

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1434-1440. 2000.

SEPPO, L. ; JAUHAINEN, T. ; POUSSA, T. ; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 77, p. 326-330, 2003.

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

SMACCHI, E., GOBBETTI, M. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. **Enzyme and Microbial technology**, v. 22, p. 687-694, 1998.

SMACCHI, E., GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, p. 129-141, 2000.

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

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 230-235, 2006.

VEJA-HERNÁNDEZ, M. C.; GÓMEZ-COELLO, A.; VILLAR, J.; CLAVERIE-MARTÍN, F. Molecular cloning na expression in yeast of caprine prochymosin. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 69-79, 2004.

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

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil dos peptídeos presente no queijo de coalho fresco produzido no município de Cachoeirinha – PE.

4.2 Objetivos específicos

- Extrair os peptídeos dos queijos de coalho de Cachoeirinha-Pernambuco;
- Determinar o perfil dos peptídeos presentes nos queijos de coalho produzidos com leite cru utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar o perfil eletroforético das proteínas e peptídeos presentes no queijo de coalho;
- Analisar a composição dos peptídeos por meio de espectrometria de massa;
- Verificar a atividade biológica dos peptídeos presentes nos queijos de coalho produzidos com leite cru mediante teste “in vitro”.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO QUEIJO DE COALHO FRESCO PRODUZIDOS NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRINHA - PE.

Artigo a ser submetido à revista Food Chemistry

Avaliação do perfil dos peptídeos bioativos do queijo de coalho fresco produzidos no Município de Cachoeirinha - Pernambuco

Giselle Maria Pereira Dias ^{*1}, Flávio de Oliveira Silva², Tatiana Souza Porto³, Patrícia L. B.

Araújo⁴, Maria Taciana Cavalcanti Holanda⁵, Ana Lúcia Figueiredo Porto⁵

¹ *Mestranda em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil*

² *Doutorando em Biociências Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil*

³ *Bolsista PNPd Capes, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil*

⁴ *Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco*

⁵ *Departamento de morfologia e fisiologia animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil*

*Autor Correspondente: Presente endereço: Rua José Paraíso 25, apto 1701, Boa Viagem,

Recife, Pernambuco. Tel: 081-33421777-91117034 Endereço de e-mail:

analuporto@yahoo.com (Porto, A. L. F.).

1 RESUMO

2

3 Extratos peptídicos solúveis do queijo de coalho coletados em março e julho de 2008,
4 no Município de Cachoeirinha localizado no Agreste de Pernambuco, Brasil foram analisados
5 quanto ao perfil cromatográfico, eletroforético, espectro de massa e atividade antimicrobiana *in*
6 *vitro* pela técnica de disco-difusão, poço e determinação da concentração inibitória mínima
7 (CIM). Perfil protéico similar foi observado tanto nas análises eletroforéticas quanto nas
8 análises de perfil cromatográfico obtidos por cromatografia de exclusão molecular para os
9 extratos peptídicos solúveis (março e julho), enquanto que os perfis cromatográficos obtidos
10 por cromatografia de troca iônica foram similares apenas para fração protéica catiônica, porém
11 apresentou perfil eletroforético diferente. Análise do espectro de massa MALDI-TOF da fração
12 dos peptídeos de peso molecular entre 100 a 7000 Da obtidos na cromatografia de exclusão
13 molecular evidenciou a presença de 5 diferentes peptídeos (1411,1197 a 1994,1279 Da). Nos
14 testes de atividade antimicrobiana apenas *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi sensível a ação do
15 extrato dos peptídeos solúveis e da fração catiônica com concentração inibitória mínima de
16 9,37 mg/mL e 6,22 µg/mL, respectivamente. Enquanto que *Enterococcus faecalis* ATCC 6057
17 foi sensível apenas ao *pool* da fração catiônica com concentração inibitória mínima de 199,37
18 µg/mL. A utilização simultânea de técnicas proteômicas no estudo do perfil protéico do queijo
19 possibilitou a identificação de proteínas e peptídeos a partir de suas massas moleculares e seu
20 efeito inibidor sobre o crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Enterococcus faecalis*
21 ATCC 6057

22

23 Palavras-chaves: queijo de coalho, extrato dos peptídeos solúveis, atividade antimicrobiana.

24

1

2 **1. Introdução**

3

4 Segundo o censo realizado em 2006 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,
5 o Agreste Pernambucano destaca-se por ser responsável por 70% da produção total da bacia
6 leiteira no Estado que segundo alguns especialistas, 40% desse volume, que corresponde a
7 cerca de 1,8 milhões de litros/ dia é destinados a fabricação de queijos.

8 Em Pernambuco o queijo de coalho é um dos principais produtos fabricados na Região
9 Agreste adquirindo importância fundamental na economia dos pequenos municípios, uma vez
10 que constitui a principal fonte de renda da propriedade familiar do Agreste (Nassu, Araújo,
11 Guedes & Rocha, 2003). Sua origem está ligada à fabricação artesanal, em numerosas
12 unidades de produção caseira e propriedades rurais de pequeno porte e/ou pequenas queijarias
13 urbanas ou rurais (Cavalcanti, Andrade, Furtado, Ferreira, Pinto & Elard, 2007).

14 Muitas substâncias biologicamente ativas têm sido encontradas em diferentes tipos de
15 queijo. Esses peptídeos são originados devido à intensa proteólise realizada por ação de
16 enzimas exógenas ou de bactérias ácido lácteas naturais durante a produção do queijo e do seu
17 tempo de maturação (Saito, Nakamura, Kitazawa, Kawai. & Itoh, 2000; Smacchi & Gobetti,
18 2000; Silva & Malcata, 2005).

19 Os peptídeos liberados a partir de proteínas alimentares durante a hidrólise ou
20 fermentação, têm ganhado interesse especial uma vez que podem influenciar em numerosas
21 respostas fisiológicas no organismo além de poder ser ingerido como componentes que
22 ocorrem naturalmente nos alimentos (Smacchi et al., 2000).

23 Proteínas dos alimentos com função biológica ou efeitos fisiológicos são chamadas de
24 peptídeos bioativos. Possuem propriedades opióides, antitrombóticas, anti-hipertensivas,

1 imunomoduladoras, antibacterianas, anti-úlceras, anti-carcinogênica e carreadora de minerais
2 (Silva et al., 2005).

3 Um número cada vez mais elevado de publicações aponta os alimentos, em especial os
4 lácteos, como principal fonte de peptídeos com inúmeras atividades biológicas. As
5 propriedades funcionais das proteínas do leite, do soro e de seus derivados, tais como iogurte e
6 queijo, têm atraído muita atenção devido a sua potente atividade antimicrobiana (Nielsen,
7 Martinussen, Flambard, Sørensen, & Otte, 2009; Hatmann & Meisel, 2007).

8 O termo peptídeo catiônico é usado para descrever os peptídeos que apresentam
9 atividade antimicrobiana (Hancock & Scott, 2000). Certamente, a maioria dos peptídeos
10 antimicrobianos catiônicos, interage com as membranas dos microrganismos patogênicos
11 devido a sua habilidade de alterar as membranas biológicas através de interações não
12 específicas com os lipídios das membranas celulares e como consequência formação de poros,
13 provocando efeitos deletérios como dissipação da força proto-motora, depleção do ATP e da
14 perda de nutrientes e metabólicos (Arouri, Dathe & Blume, 2009).

15 Outra propriedade dos peptídeos antimicrobianos catiônicos é a capacidade de
16 atravessar a membrana para alcançar um alvo dentro da célula bacteriana e a capacidade de
17 distinguir células bacterianas das células de mamíferos, baseado na composição diferente dos
18 lipídios das membranas dessas células (Arouri et al., 2009).

19 A pesquisa por peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana em alimentos lácteos
20 regionais, como o queijo de coalho, é importante para garantir uma maior valorização do
21 produto, além de permitir o desenvolvimento da região através da agregação de valor ao
22 produto.

1 Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de peptídeos
2 bioativos no queijo de coalho fresco produzidos no município de Cachoeirinha localizado no
3 Agreste de Pernambuco, Brasil.

4

5

6 **2. Material e métodos**

7

8 *2.1. Queijo*

9 As amostras de queijo de coalho produzidas com leite cru foram obtidas na unidade
10 produtora localizada no município de Cachoeirinha – PE durante os meses de março e julho de
11 2008.

12

13 *2.2 Extração dos peptídeos solúveis*

14 A extração dos peptídeos solúveis do queijo de coalho foi realizada segundo a
15 metodologia de Gómez-Ruiz, Ramos & Recio, 2002, modificada com relação à mudança na
16 velocidade (7000xg) e tempo de rotação (20 minutos). Para a extração de peptídeos foram
17 utilizados 40g das amostras dos queijos que foram homogeneizadas com duas vezes o seu peso
18 em água ultrapura, utilizando um homogeneizador automático (Nissei-am) na velocidade de
19 3000xg por 10 minutos, em seguida centrifugada três vezes a 7000xg por 20 minutos a 4°C.
20 Após este procedimento, o sobrenadante final foi filtrado em papel de filtro quantitativo
21 (Whatman no. 40), liofilizado e armazenado a – 20°C e denominado extrato peptídico solúvel,
22 até serem utilizados nas etapas cromatográficas.

23

24 *2.3 Dosagem protéica*

1 O conteúdo protéico dos extratos dos peptídeos solúveis do queijo de coalho, e das
2 frações obtidas após Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi determinado
3 segundo o método descrito por Warburg & Christian, 1941.

4 5 *2.4 Cromatografia dos peptídeos solúveis do queijo*

6 Os extratos dos peptídeos solúveis do queijo de coalho foram submetidos à
7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em aparelho do tipo AKTA system –
8 Amersham Pharmacia Biotech (New Jersey, USA).

9 Como primeiro passo das análises cromatográficas, foi utilizada uma coluna de
10 exclusão molecular tipo Superdex Peptide HR 10/30 (D = 1,0 cm x C = 30,0 cm) utilizando
11 água ultrapura tanto como eluente das corridas cromatográficas quanto para equilibrar a coluna.
12 O volume de amostra injetado foi de 0,25 mL o que correspondeu a uma massa de 20mg de
13 proteína da amostra. Frações de 1 mL foram coletadas. As proteínas foram eluídas a fluxo de
14 0,2 mL/min.

15 No segundo passo, os extratos de peptídeos solúveis foram analisados em coluna
16 cromatográfica de troca iônica tipo Mono Q HR 10/10 (D = 10,0 cm x C = 10,0 cm), sob baixa
17 pressão, a temperatura ambiente (25°C). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM,
18 pH 7,0, eluídas isocraticamente ao fluxo de 1,0mL/min. A fração protéica catiônica não ligada
19 à resina foi eluída em tampão de equilíbrio, enquanto que as proteínas ligadas foram eluídas no
20 tampão de equilíbrio em gradiente de NaCl a 1M, representando a fração de proteínas
21 aniônicas. O volume de amostra injetado foi de 0,5 mL que correspondeu a uma massa de
22 40mg de proteína da amostra. Frações de 1,5 mL foram coletadas. Os *pools* das frações
23 referentes aos picos foram liofilizados e armazenados para posterior análise.

24 Todas as análises cromatográficas foram monitoradas na absorbância de 260 e 280nm
25 através de um detector ultravioleta.

1

2 *2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE*

3 Os extratos dos peptídeos solúveis do queijo de coalho, o *pool* dos picos obtidos por
4 cromatografia de exclusão molecular bem como o *pool* dos picos catiônicos obtidos após
5 cromatografia de troca iônica foi utilizado como amostra para análise do perfil eletroforético.
6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) segundo Laemmli, 1970 foi
7 constituída de um gel de separação com 15% de acrilamida: N,N'-bis-metileno acrilamida em
8 1,5M de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 10% de SDS e um gel de concentração com 4% de
9 acrilamida: N,N'-bis-metileno acrilamida em 1,5M de tampão Tris-HCl, pH 6,8 foram
10 utilizados. As amostras foram dissolvidas em 1,5M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença
11 de 10% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida as amostras foram aquecidas a 100°C
12 por 3 minutos, onde 10µg de cada amostra a ser analisada. Marcadores de alto peso moleculares
13 (220.000 – 53.000 Da) e baixo peso molecular (97.000 – 14.400 Da) (GE Healthcare, USA)
14 foram utilizados. A corrida eletroforética foi executada a 600 V em corrente constante de 25mA
15 por 6 horas. Decorrido esse tempo, o gel foi corado azul de Coomassie e nitrato de prata.

16

17 *2.6 Análise por Espectrometria de massa em MALDI-TOF*

18 O *pool* dos picos II obtidos através de análises em cromatografia de exclusão molecular
19 teve suas Massas Moleculares (MM) determinadas por espectrometria de massa. As análises
20 foram realizadas em um espectrômetro do tipo MALDI-TOF com aparelho do tipo Autoflex III
21 (Bruker Daltonics, Alemanha), cuja matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico
22 em acetonitrila 33% e ácido trifluoroacético 0,1%, operada com modo de aquisição linear
23 positivo.

24

25 *2.7 Atividade antimicrobiana*

1 A atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de difusão em disco, poço e
2 determinação da concentração inibitória mínima (CIM) realizada segundo normas da NCCLS,
3 2003.

4 Na determinação da atividade antimicrobiana pela técnica de disco-difusão e poços,
5 300mg/ mL do extrato dos peptídeos solúveis foram diluídos em água e testados frente às
6 bactérias Gram-positiva: *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633,
7 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e as bactérias Gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC
8 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665.

9 Os microrganismos testes foram crescidos em caldo TSB (Tryptic Soy Both) a 37°C por
10 24 horas. A densidade do inóculo foi padronizada até atingir turbidez óptica comparável a
11 solução padrão de escala de MacFarland a 0,5 o que resulta numa suspensão contendo
12 aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ mL. Em seguida, a suspensão do inóculo foi semeada na
13 superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton com auxílio do swab esterilizado. Após este
14 procedimento discos de papel de filtro de 5 mm esterilizados foram embebidos pelo extrato dos
15 peptídeos solúveis e aplicados na superfície do Agar. Para os testes de difusão em poços 50 µL
16 da solução do extrato dos peptídeos solúveis foram adicionados em poço de 8mm de diâmetro
17 no meio de cultura solidificado. As placas foram colocadas em estufa a 37°C e examinadas
18 após 24 horas. O halo de inibição foi considerado como a área sem crescimento detectável a
19 olho nu ao redor do disco e do poço e mensurado seu tamanho em milímetros através do uso de
20 paquímetro. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

21 Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizadas
22 microplacas de poliestireno com 96 poços esterilizados. Cada poço da placa recebeu inóculo de
23 cultura ajustadas ao padrão MacFarland 0,5 diluída 1:10, caldo Mueller Hinton e as amostras
24 do extrato dos peptídeos solúveis do queijo e *pool* catiônico preparadas de tal maneira que o
25 volume final em cada poço fosse de 100µL. No teste foram avaliadas tanto as amostras do

1 extrato peptídico do queijo de coalho nas concentrações de 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,37,
2 4,68, 2,34, 1,17, 0,58, 0,29, 0,14, 0,07 e 0,03 mg/mL quanto o *pool* catiônico correspondente às
3 frações obtidas após cromatografia de troca iônica nas concentrações de 797,5, 398,75, 199,37,
4 99,68, 49,84, 24,92, 12,46, 6,23, 3,11, 1,55, 0,77, 0,38, 0,19 e 0,09 µg/ mL necessárias para a
5 determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em seguida as microplacas foram
6 seladas e incubadas a 37°C por 24 horas. Foi utilizado controle negativo (caldo Mueller Hinton)
7 e positivo (caldo Mueller Hinton e inóculo de microrganismo teste). A detecção da
8 concentração inibitória mínima foi detectável a olho nu pela ausência de turvação do meio. O
9 efeito bactericida foi considerado pela não turvação do meio de cultura nos poços das placas de
10 poliestireno e ausência de crescimento bacteriano após inoculação em placa de Petri contendo
11 ágar nutriente enquanto que o efeito bacteriostático foi definido para aquelas concentrações que
12 macroscopicamente não apresentaram turvação do meio de cultura, mas crescimento após
13 cultivo em ágar nutriente.

14

15 **3. Resultados e discussão**

16

17 *3.1 Análises do perfil cromatográfico e eletroforético dos extratos dos peptídeos solúveis, do*
18 *pool dos picos obtidos por cromatografia de exclusão molecular e do pool dos picos catiônicos*
19 *obtidos por cromatografia de troca iônica*

20 Os perfis cromatográficos obtidos após eluição em coluna de exclusão molecular dos
21 extratos peptídicos solúveis, da primeira (março/ 2008) e segunda coleta (julho/2008),
22 apresentaram-se similares, uma vez que ambos mostraram dois picos, no mesmo tempo de
23 retenção (Figura 1). O tempo de retenção do Pico I ocorreu a 40 minutos, enquanto que o Pico
24 II ocorreu a 90 minutos.

1 Os perfis cromatográficos obtidos mediante a utilização de coluna de troca iônica foram
2 similares apenas para fração protéica catiônica, uma vez que os peptídeos apresentaram o
3 mesmo tempo de retenção. Enquanto que a fração aniônica mostrou perfil diferente, no qual
4 foram observados 3 picos que foram eluídos em diferentes tempos de retenção (Figura 2).

5 As análises de perfil eletroforético das proteínas do extrato dos peptídeos do queijo de
6 coalho (Figura 3: Linha 2 e 3) não apresentaram alterações quanto ao número de bandas, uma
7 vez que foi possível observar, um total de 17 bandas tanto para o extrato dos peptídeos solúveis
8 da primeira quanto da segunda coleta.

9 O *pool* dos picos I da primeira e segunda coleta (Figura 3: Linha 4 e 5) apresentaram
10 um total de 14 e 15 bandas, respectivamente. A similaridade nos perfis eletroforéticos
11 observadas entre as amostras coletadas em meses diferentes, pode sugerir uma uniformidade na
12 alimentação do rebanho, assim como no padrão racial do mesmo, tendo em vista o
13 conhecimento da influência destes parâmetros na composição do leite, matéria prima para a
14 fabricação do queijo (Perry, 2004).

15 Na eletroforese SDS-PAGE (Figura 3) podemos observa a presença de mais uma banda
16 com peso aproximado entre 170 e 116 kDa (Figura 3: Linha 4) para o *pool* dos picos I da
17 primeira coleta, não foi visualizada nas demais amostras analisadas.

18 O *pool* dos Picos II que correspondem aos peptídeos com peso molecular entre 100 -
19 7000 Daltons (Figura 3: Linha 6 e 7 referente a primeira e segunda coleta, respectivamente)
20 obtidos da cromatografia de Exclusão molecular, não foram visualizados na eletroforese
21 mesmo depois da coração com prata tendo suas massas moleculares e seus possíveis peptídeos
22 identificados através de análise em espectro de massa.

23 Bandas com massa (M_r) de aproximadamente 76, 66 e 14,4 kDa foram observadas,
24 tanto nos extratos dos peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha (Figura 3: Linha
25 2 e 3) quanto no *pool* dos Picos I (Figura 3: Linha 4 e5) obtidas após cromatografia de exclusão

1 molecular. Estes peptídeos podem corresponder a lactoferrina (80 kDa), soroalbumina (66,33
2 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa), respectivamente. A lactoferrina, a soroalbumina e a α -
3 lactoalbumina são proteínas encontradas no soro e são referidas como precursoras dos
4 peptídeos bioativos (Smacchi & Gobetti, 2000). A presença destas proteínas no queijo é
5 resultado da prensagem da massa necessária a eliminação do soro. Assim, por serem proteínas
6 do soro, podem ser eliminadas em maior ou menor quantidade dependendo da força empregada
7 durante a prensagem (Cavalcanti, Andrade, Furtado, Ferreira, Pinto & Elard, 2007).

8 Papa, Robertson, Rigby, Mellon, Kandarakis & Mills, 2008 analisaram o perfil de
9 proteínas e peptídeos (M_r 206 a 6,5 kDa) de extratos solúveis do queijo Teleme produzidos com
10 leite de vaca maturado por 120 dias e também observaram na eletroforese SDS-PAGE
11 monodimensional bandas equivalentes a soroalbumina e α – lactoalbumina. No presente
12 trabalho também foi observado bandas equivalentes a α – lactoalbumina e soroalbumina tanto
13 no extrato dos peptídeos solúveis (Figura 3: Linha 2 e 3) quanto nos *pool* obtidos após análises
14 em cromatografia de exclusão molecular (Figura 3: Linha 4 e 5) e troca iônica (Figura 4: Linha
15 4 e 5).

16 Marques, Custódio, Goulart, Giordano, Giordano & Monti, 2005 conseguiram separar
17 as proteínas do soro do leite (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e soroalbumina bovina) por
18 meio de uma coluna de exclusão molecular, afirmando ser este um método de separação eficaz
19 e facilmente realizado para a separação de proteínas. Contudo, neste trabalho, observamos que
20 a separação destas proteínas também pode ser facilmente realizada por meio de eletroforese.

21 Na eletroforese apresentada na figura 3 e 4, podemos observar a presença de bandas
22 com massa entre (M_r) 20 a 30 kDa que estão presentes nos extratos dos peptídeos solúveis
23 (Figura 3: Linha 2 e 3), no *pools* obtido por cromatografia de exclusão molecular (Figura 3:
24 Linha 4 e 5) e no *pools* catiônico da segunda coleta obtido por cromatografia de troca iônica
25 (Figura 4: Linha 5), não sendo observada a presença dessas bandas no *pools* catiônico da

1 primeira coleta. Estas bandas com massa entre (M_r) 20 a 30 kDa foram visualizadas no gel de
2 eletroforese (figura 3 e 4) e são resultantes da hidrólise da caseína pela ação da quimosina
3 (enzima coagulante) utilizada durante a fabricação do queijo originando os fragmentos de α_{S1} ,
4 α_{S2} , β e para-*k*-caseína que são referidos como as principais proteínas do queijo (Farkye & Fox,
5 1992). Os fragmentos de α_{S1} -caseína (M_r 23,61), α_{S2} -caseína (M_r 25,23), β -caseína (M_r 23,98) e
6 *K*-caseína (M_r 19,02), originadas pela hidrólise por quimosina foram visualizadas no a no
7 trabalho de Egito, Rosinha, Laguna, Miclo, Girarder & Gaillard, 2006 ao avaliarem por
8 métodos eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE adulteração do leite de cabra pela
9 adição de leite de vaca. Vannini et al., 2008 também detectaram a presença de β e α -caseína ao
10 analisar eletroforéticamente o perfil das proteínas durante o processamento de queijo Pecorino
11 fabricados com leites submetidos a diferentes pré-tratamentos. Enquanto que Krüger, Silva,
12 Vedana, Tiene, Cândido, 2006 detectaram atividade antimicrobiana de peptídeos do leite de
13 vaca após a hidrólise da caseína por ação da tripsina.

14 O perfil eletroforético do *pool* dos picos catiônicos (Figura 5: Linha 4 e 5) apresentaram
15 alterações quanto ao número de bandas, uma vez que foram visualizadas um total de 7 (Figura
16 4; Linha 4) e 10 bandas (Figura 4: Linha 5) para a 1^o e 2^o coleta, respectivamente.

17 A presença de bandas com massa aproximadamente de (M_r) de 220, 170, 76, 66, 20,1 e
18 14,4 kDa foram visualizadas tanto nas amostras referentes aos extratos de peptídeos solúveis do
19 queijo de coalho de Cachoeirinha quanto nos *pool* dos picos catiônicos podendo ser referidas
20 como peptídeos catiônicos.

21

1 *3.2 Análises em espectro de massa MALDI-TOF da fração dos peptídeos de peso molecular*
2 *entre 100 a 7000 Da obtidos na cromatografia de exclusão molecular*

3 O espectro de massa evidenciou a presença de 5 diferentes peptídeos (figura 5) na
4 fração de peptídeos com peso molecular entre 100 a 7000 Da obtidos na cromatografia de
5 exclusão molecular.

6 Na figura 5 é possível observar linhas que ligam picos em seqüência e letras (Q =
7 glutamina; E = ácido glutâmico) que significam resíduos de aminoácidos correspondentes a
8 diferença de massa de um peptídeo a outro. Assim, o peptídeo de massa 1.411,1194 Da difere
9 do peptídeo de massa 1.539,1335 Da apenas pela presença do aminoácido glutamina (Q),
10 enquanto que este segundo difere do peptídeo de massa 1.668,1412 Da apenas pelo resíduo de
11 ácido glutâmico (E). Ainda pode ser observada na Figura 5, a diferença de massa de 212,02 e
12 113,97 Daltons de um peptídeo a outro.

13 No trabalho de Gagnaire, Mollé, Herrouin & Léonil, 2001 a técnica de espectrometria
14 de massa foi utilizada com o objetivo de estudar mudanças as proteolíticas e identificar
15 possíveis peptídeos gerados durante a maturação do queijo Enmental e permitiu a
16 identificação de 91 peptídeos gerados a partir da α_{S1} , β , α_{S2} e K-caseína.

17 A identificação de 16 peptídeos em queijo tipo Cheddar através de análise em espectro
18 de massa também foi reportada no trabalho de Gouldsworthy, Leaver & Banks, 1996. Dos 16
19 peptídeos identificados por Gouldsworthy et al., 1996 oito foram derivados da α_{S1} -caseína, sete
20 da β -caseína e um da α_{S2} -caseína. Singh, Foz & Healy, 1995 também identificaram 45
21 peptídeos no extrato solúvel em água do queijo tipo Cheddar originados da β -caseína,
22 especialmente de uma região curta localizada no meio da sequencia N-terminal da molécula
23 e de seis peptídeos derivados da α_{S1} -caseína e β -lactoglobulina.

1 Uso de técnicas de espectrometria de massa para análise de proteínas e peptídeos de
2 queijo também foi observada no trabalho de Ferranti et al., 1997 e permitiu a identificação de
3 91 e 31 oligopeptídeos, com massa moleculares abaixo de 3kDa, em queijo tipo Grana Padano
4 maturado por 14 e 38 meses, respectivamente. No trabalho de Addeo, Chianese, Sacchi,
5 Musso, Ferranti & Marloni, 1994 as análise em espectro de massa de 120g de queijo
6 Parmigiano-Reggiano solúvel em ácido tricloroacético também permitiu a identificação de 39
7 oligopeptídeos, dos quais 19 são fosfopeptídeos e derivados a partir das regiões 1-20 e 6-28 da
8 β -caseína.

9

10 3.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos solúveis do queijo de coalho de 11 Cachoeirinha - PE

12 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi o único microrganismo sensível à ação do extrato dos
13 peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha e ao *pool* das frações catiônicas em
14 todos os ensaios realizados, uma vez que apresentou média de halos de inibição de 5,25 mm e
15 3,75 mm para a técnica de difusão em poços e disco-difusão, respectivamente.

16 As concentrações do extrato dos peptídeos solúveis e do *pool* das frações catiônicas
17 obtidas após cromatografia de troca iônica testadas foram capazes de inibir o crescimento de
18 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sendo a concentração inibitória mínima para o extrato de
19 peptídeos solúveis de 9,37 mg/ mL e de 6,22 μ g/ mL para o *pool* da fração catiônica. Ainda, o
20 *pool* da fração catiônica foi capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 6057
21 na concentração inibitória mínima de 199,37 μ g/ mL.

22 A inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Enterococcus faecalis*
23 ATCC 6057 por peptídeos do queijo de coalho é fator importante na sanidade do produto, uma
24 vez que algumas cepas de *Bacillus subtilis* podem produzir uma toxina altamente termoestável
25 similar à produzida por *Bacillus cereus* e provocar, após a ingestão dos alimentos

1 contaminados, sintomas como vômito e dores abdominais (Jawetz, Melnick, Adelberg, Brooks,
2 Butel & Ornston, 1991). Enquanto que a inibição do crescimento de *Enterococcus faecales*
3 impede que estas bactérias assumam importância clínica, uma vez que também são
4 considerados como patógenos oportunistas do homem, podendo desenvolver um processo
5 infeccioso, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (Eaton & Gasson, 2001).

6 Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína pela
7 tripsina também foi observada no trabalho de Krüger et al., 2006 frente à *Staphylococcus*
8 *aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogene* em testes de
9 susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo.

10 Os derivados da caseína, gerados pela hidrólise da quimosina durante a produção do
11 queijo, são fonte de peptídeos antimicrobianos (Haque & Chand, 2008) e exercem uma forte
12 ação protetora contra microrganismos patogênicos (Silva et al., 2005). Caseidinas produto
13 obtido a partir da hidrólise mediada por quimosina, foi o primeiro peptídeo de defesa purificado
14 a exibir atividade contra *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus*
15 *pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* (Lahov & Regelson, 1996). A
16 isracidina (fragmento α_{s1} -caseína) tem mecanismo de ação, *in vivo*, típica a atividade
17 antibiótica, contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e que ainda pode proteger vacas
18 e ovelhas contra mastite (Lahov & Regelson, 1996).

19

20 **4. Conclusão**

21

22 Este trabalho é o primeiro relato da caracterização do perfil peptídico do queijo de
23 coalho artesanal do Município de Cachoeirinha – PE, sendo possível detectar peptídeos de
24 massa moleculares de 14,400 a 170,000 Da (Eletroforese SDS-PAGE monodimensional) e

1 1411,1197 a 1994,1279 Da (MALDI-TOF). Os resultados demonstram a presença de peptídeos
2 bioativos no extrato dos peptídeos solúveis e no *pool* dos picos catiônicos com capacidade de
3 inibidor o crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Enterococcus faecalis* ATCC 6057.

4

5 **Agradecimentos**

6 Aos autores, ao suporte técnico dos Laboratórios de Imunopatologia Keizo Azami
7 (LIKA) e Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) e ao Centro de Ciências e
8 Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE) e aos financiamentos concedidos pela
9 Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

10

11

12 **Referências**

13 Addeo, F., Chianese, L., Sacchi, R., Musso, S. S., Ferranti, P., & Marloni, A. (1994).

14 Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g
15 trichloroacetic acid/l. *The Journal of Dairy Research*, 61, 3, 365-74.

16 Arouri, A., Dathe, M., Blume, A. (2009). Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: A

17 mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes.

18 *Biochimica et Biophysica Acta*. doi:10.1016/j.bbamem.2008.11.022.

19 Cavalcanti, J. F. M., Andrade, N. J., Furtado, M. M., Ferreira, C. L. L. F., Pinto, C. L. O., &

20 Elard, E. (2007). Processamento do queijo de coalho regional empregando leite

21 pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 24, 205-214.

22 Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence

23 determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl.*

24 *Environ. Microbiol.*, 67, 1628-1635.

- 1 Egito, A. S., Rosinha, G. M. S., Laguna, L. E., Miclo, L., Girarder, J. M., & Gaillard, J. L.
2 (2006). Método eletroforético rápido para a detecção da adulteração do leite caprino com
3 leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 932-939.
- 4 Ferranti, P., Itolli, E., Barone, F., Malorni, A., Garro, G., Laezza, P., Chianese, L., Migliaccio,
5 F., Stingo, V., & Addeo, F. (1997). Combined high resolution chromatographic techniques
6 (FPLC and HPLC) and mass spectrometry-based identification of peptides and proteins in
7 Grana Padano cheese. *Dairy Science and Technology*, 77, 6, 683-697.
- 8 Farkye, N. Y., Fox, P. F. (1992). Contribution of plasmin to cheddar cheese ripening: effect
9 of added plasmin. *J. Dairy Res.*, 59, 209-216.
- 10 Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M., & Léonil, J. (2001). Peptides Identified during
11 Emmental Cheese Ripening: Origin and Proteolytic Systems Involved. *Journal of*
12 *Agricultural and Food Chemistry*, 49, 9, 4402-4413.
- 13 Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme- inhibitory
14 peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International*
15 *Dairy Journal*, 12, 697-706.
- 16 Gouldsworthy, A. M., Leaver, J. & Banks, J. M. (1996). Application of a mass spectrometry
17 sequencing technique for identifying peptides present in cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 6,
18 781-790.
- 19 Hancock, R.E.W., & Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses.
20 *Colloquium*, 97, 8856–8861.
- 21 Haque, E., & Chand, R. (2008). Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from
22 milk proteins. *Eur Food Res Technol.*, 227, 7–15.
- 23 Hatmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from
24 research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 63–169.

- 1 Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S., & Ornston, L. N. (1991).
2 Patogenia da infecção bacteriana e resistência do hospedeiro à infecção. in: *Microbiologia*
3 *Médica*, ed. Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S., &
4 Ornston, L. N., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 109-123.
- 5 Krüger, C. C. H., Silva, C. A., Vedana, M. I. S., Tiene, C., & Cândido, L. M. B. (2006).
6 Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina. *Alim. Nutr.*, 17, 7-12.
- 7 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of
8 bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 380 – 685.
- 9 Lahov, E., Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived
10 substance from milk: Caseicidin, isracidin peptides. *Food and chemical Toxicology*, 34,
11 131-145.
- 12 Marques, D. P., Custódio, M. F., Goulart, A. j., Giordano, R. C., Giordano, R. L. C., & Monti,
13 R. (2005). Separação das proteínas do soro do leite por DEAE-TRISACRYL. *Alim. Nutr.*,
14 16, 17-20.
- 15 Nassu, R. T., Araújo, R. dos S., Guedes, C. G. M., & Rocha, R. G. de A. (2003). Diagnóstico
16 das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e
17 manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza, CE. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*.
18 Embrapa Agroindústria Tropical, n. 11, p. 24, 2003. Disponível em:
19 http://www.cnpq.br/publica/pub/BolPesq/bd_11.pdf. Acesso em 28 de agosto de
20 2009.
- 21 Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K., & Otte, J. (2009). Peptide profiles
22 and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect
23 of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19,
24 155–165.

- 1 Papa, E. C., Robertson, J. A., Rigby, N. M., Mellon, F., Kandarakis, I., & Mills, E. N. C.
2 (2008). Application of proteomic techniques to protein and peptide profiling of Teleme
3 Cheese made from different types of milk. *International Dairy Journal*, 18, 605-614.
- 4 Perry, K. S. P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim.*
5 *Nova*, 27, 2, 293-300.
- 6 Saito, T., Nakamura, T., Kitazama, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and structural
7 analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda Cheese. *Journal of Dairy*
8 *Science*, 83, 1434-1440.
- 9 Singh, T. K., Fox, P. F., Healy, A. (1995). Water-soluble peptides in Cheddar cheese : isolation
10 and identification of peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction.
11 *Journal of dairy research*, 62, 4, 629-640.
- 12 Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International*
13 *Dairy Journal*, 15, 1-15.
- 14 Smacchi, E., & Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and
15 interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129-141.
- 16 Vannini, L., Patrignani, F., Lucci, L., Ndagijimana, M., Vallicelli, M., Lanciotti, R., &
17 Guerzoni, M. E. (2008). Effect of a pre-treatment of Milk with high pressure
18 homogenization on yield as well as on microbiological, lipolytic and proteolytic patterns of
19 “Pecorino” cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 329-335.
- 20 Vaughan, E. E., Caplice, E., & Looney, R. (1994). Isolation from food sources, of lactic acid
21 bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 118-123.
- 22 Warburg, O., & Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation des garungens ferments
23 enolasc. *Biochemioche Zeitschrift*, 3190, 384 – 421.

24

25

LEGENDAS DAS FIGURAS

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

Fig. 1. Perfil cromatográfico dos extratos dos peptídeos solúveis dos queijos de coalho de Cachoeirinha - PE mediante eluição em coluna Superdex Peptide HR 10/30: (A) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da primeira coleta - março/2008; (B) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da segunda coleta - julho/ 2008. Eluição das proteínas com água ultrapura a fluxo de 0,2 mL/ min.

Fig. 2. Perfil cromatográfico dos extratos dos peptídeos solúveis dos queijos de coalho de Cachoeirinha - PE mediante eluição em coluna de troca iônica Mono Q HR 10/10: (A) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da primeira coleta - março/2008; (B) perfil dos peptídeos extraídos do queijo da segunda coleta - julho/2008. Proteínas catiônicas eluídas em 25mM de tampão Tris-HCl, pH 7,0 e proteínas aniônicas eluídas em 25mM de tampão Tris-HCl, pH 7,0 em gradiente de NaCl a 1M, ambos a fluxo de 1,0 ml/ min., sob baixa pressão e temperatura ambiente.

Fig. 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do extrato de peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha – PE e do *pool* dos picos obtido após cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide HR 10/30. Linha 1: padrão molecular de alto peso (220 – 53 kDa); Linha 2: extrato peptídico solúvel (1° coleta); Linha 3: Extrato peptídico solúvel (2° coleta); Linha 4: *Pool* dos Picos I (1° coleta); Linha 5: *Pool* dos Picos I (2° coleta); Linha 6: *Pool* dos Picos II (1° coleta); Linha 7: *Pool* dos Picos II (2° coleta); Linha 8: padrão molecular de baixo peso (97 – 14,4kDa).

Fig. 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos extratos de peptídeos solúveis do queijo de coalho de Cachoeirinha – PE e do *pool* dos picos catiônicos obtidos após cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 10/10. Linha 1: padrão molecular de alto peso (220 – 53 kDa); Linha 2: extrato dos peptídeos solúveis (1° coleta); Linha

1 3: Extrato dos peptídeos solúveis (2^ocoleta); Linha 4: *Pool* dos picos catiônicos
2 (1^ocoleta); Linha 5: *Pool* dos picos catiônicos (2^o coleta); Linha 6: padrão molecular de
3 baixo peso (97 – 14,4kDa).

4 Fig. 5. Espectro de massa obtido pelo MALDI-TOF das frações referentes ao *pool* dos pico II
5 obtidas por cromatografia de exclusão molecular do extrato peptídico solúvel da
6 primeira coleta. Linhas que ligam picos em sequência e as letras (Q = glutamina, E =
7 ácido glutâmico) correspondentes à diferença de massa de um peptídeo para outro.

8

9

10

11

12

13

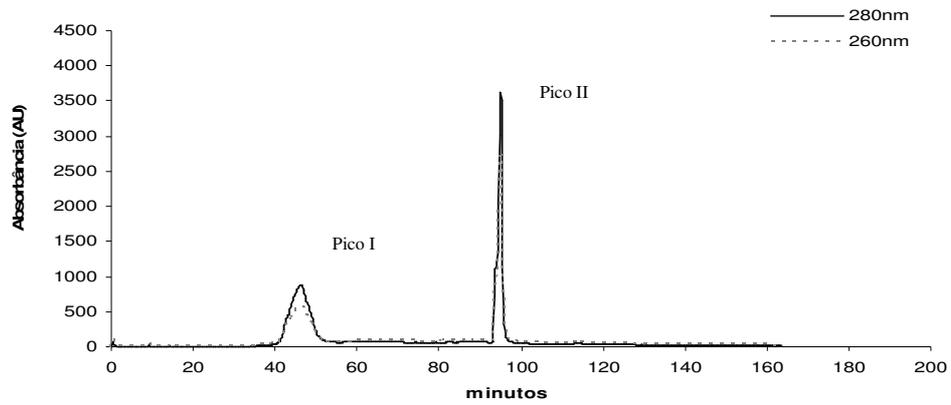
14

15

16

17

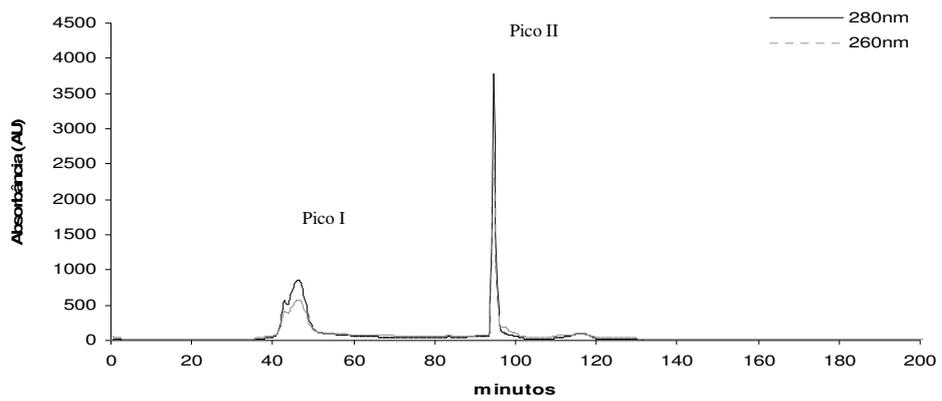
18



1

2 (A)

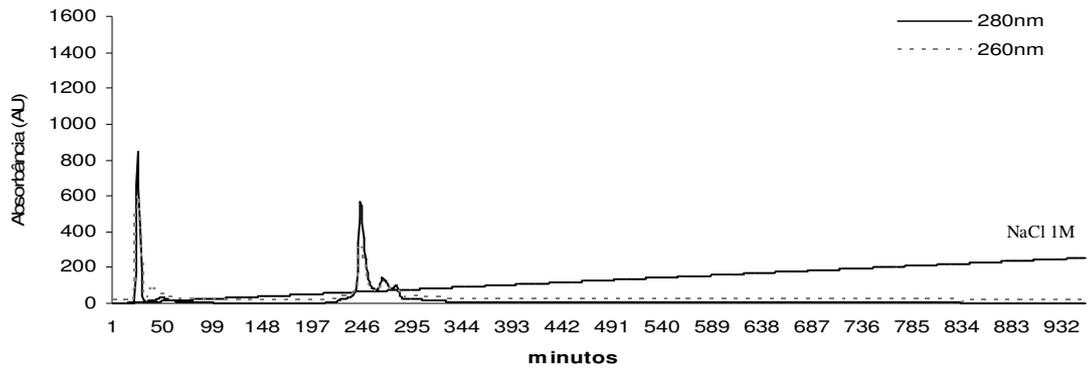
3



4

5 (B)

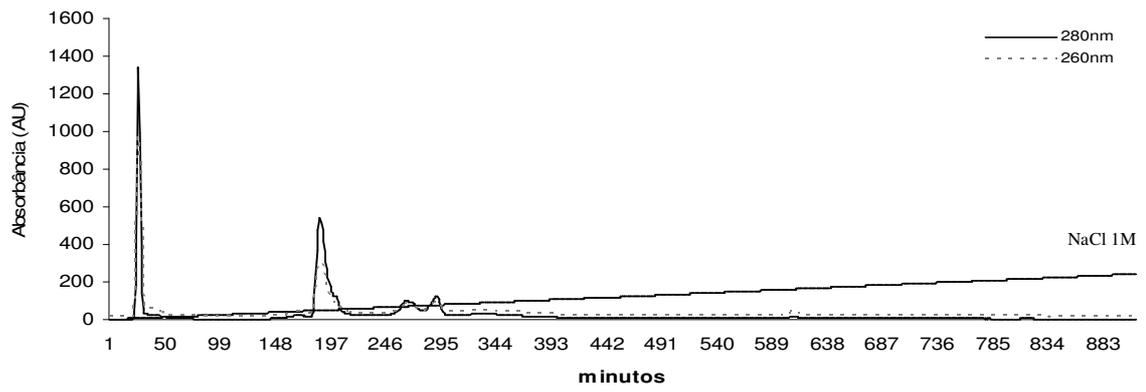
6 Fig. 1



1

2 (A)

3



4

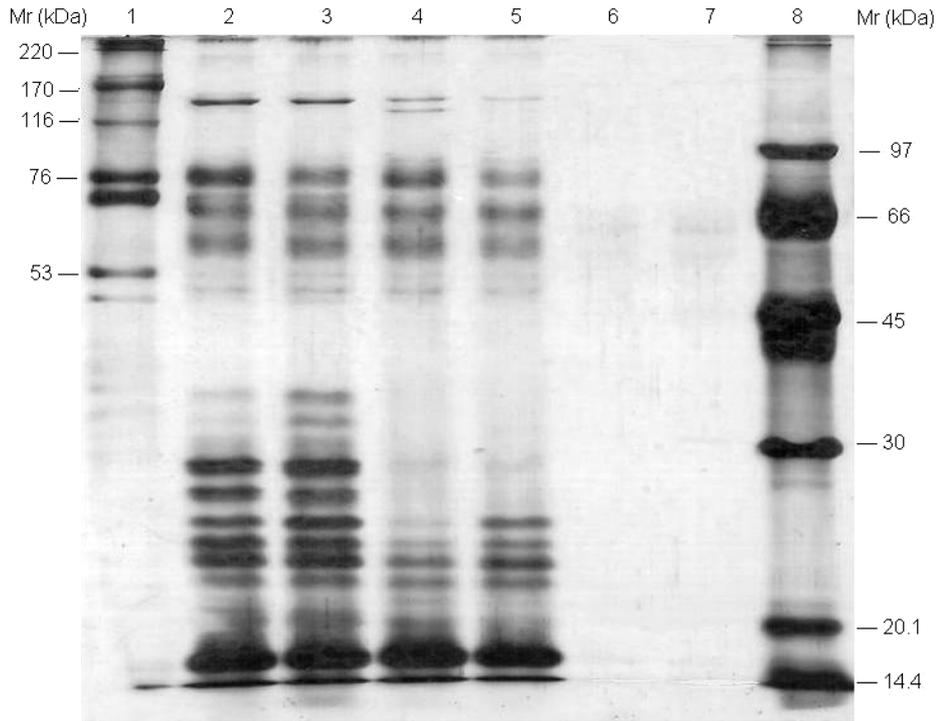
5 (B)

6 Fig. 2

7

8

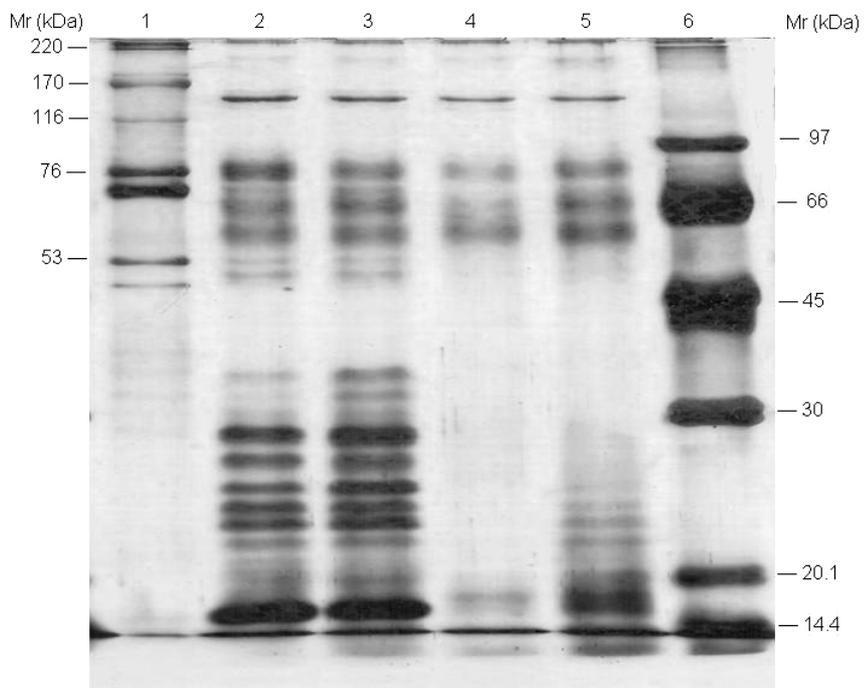
9



1

2 Fig. 3

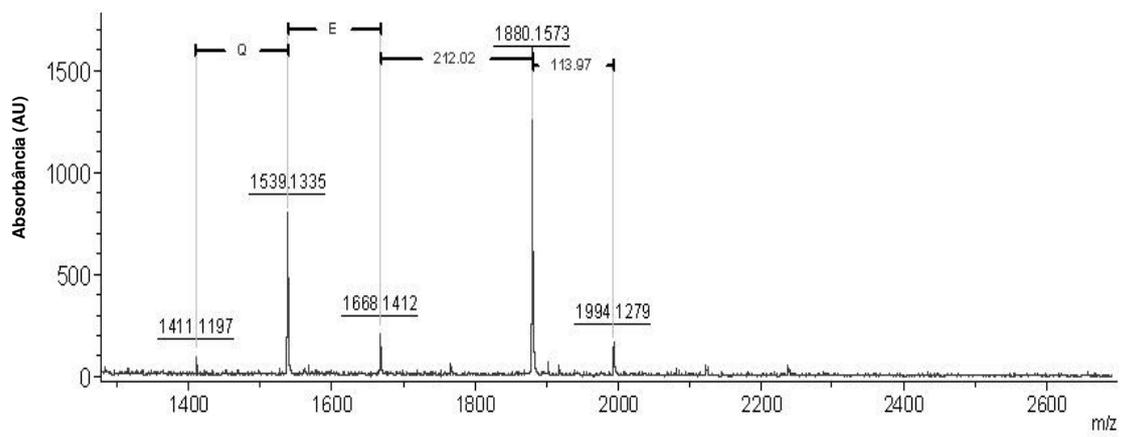
3



4

5 Fig. 4

1



2

3 Fig. 5

4

5