



**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES – URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DAIANE PRECI

**CONCENTRAÇÃO DE SORO DE LEITE OVINO POR ULTRAFILTRAÇÃO E
DIAFILTRAÇÃO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

**ERECHIM, RS - BRASIL
JUNHO DE 2018**



**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES – URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CONCENTRAÇÃO DE SORO DE LEITE OVINO POR ULTRAFILTRAÇÃO E
DIAFILTRAÇÃO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

DAIANE PRECI

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

JUNHO DE 2018

Concentração de soro de leite ovino por ultrafiltração e diafiltração para hidrólise enzimática e obtenção de peptídeos bioativos

Daiane Preci

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Juliana Steffens, Dra./ URI - Erechim
Orientadora

Prof^a. Clarice Steffens, Dra./ URI - Erechim
Orientadora

Prof^a. Elisandra Rigo, Dra./ UDESC-Pinhalzinho
Membro da banca

Prof. Vandrê Barbosa Brião, Dr./ UPF – Passo Fundo
Membro da banca

Prof^a. Eunice Valduga, Dra./ URI - Erechim
Membro da banca

Prof^a. Ilizandra Aparecida Fernandes Dra./ URI-Erechim
Membro da banca

Erechim, Junho de 2018

*Dedico esta conquista ao meu esposo,
meus pais e minhas irmãs,
minha maior riqueza!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, Diogo Thorstenberg, com o qual divido a vida com cumplicidade e companheirismo, agradeço por todo respeito e incentivo aos meus sonhos. Aos Meus pais, Valdir e Liane Preci, por todos os bons exemplos de lealdade, honestidade, responsabilidade, superação e pelo apoio incondicional. As minhas irmãs, Tatiana, Daciele e Dainara, pelo encorajamento e carinho de sempre; presentes Divino. A minha irmã de alma e coração, Josiane Pretto, por estar presente em todos os momentos.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões de Erechim e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Em especial, as minhas queridas mestres e orientadoras, Dra. Juliana Steffens e Dra. Clarice Steffens, pessoas incríveis, exemplo de humildade e paciência, a quem devo carinho e admiração por todo suporte intelectual e motivacional. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação desta instituição, especialmente aos professores Dr. Rogério Luis Cansian, Dra. Geciane Toniazzi Backes, Dr. Rogério Marcos Dallago e Dr. Claudio Zarzewski, por sempre estarem dispostos a auxiliar no que fosse necessário.

Às professoras que participaram da banca de seminário, Dra. Eunice Valduga, professora desta instituição e Dra. Andréia Maria Faion, professora do SENAI de Chapecó-SC, pelos apontamentos e sugestões.

A minha amiga de longos anos, Dra. Ilizandra Fernandes, um ser humano incrível, pela colaboração, incentivo e cordialidade.

A minha colega e amiga, Josiane Kilian pelas longas horas de experimentos e por abdicar dos seus projetos para auxiliar minha pesquisa.

À Glaciela Scherer, pelos alegres dias de convívio e parceria.

À mestranda Bruna M. Saorin Puton e ao bolsista Mateus B. Nunes pela dedicação e contribuição. Ao Roberto Verlindo e à professora Dra. Ana Sara Castaman pela assessoria e receptividade.

À equipe da prestação de serviço dessa instituição, Marcieli Peruzzolo e Débora Ferasso, e às funcionárias da central de laboratório, Rosi e Vera, pela assistência.

À empresa Gran Paladare, por ter cedido a matéria-prima e ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) de Chapecó-SC, pela

disponibilização dos laboratórios e equipamentos e suas professoras Creciana Maria Endres e Katia Joana Verdi por toda colaboração.

À Universidade de Passo Fundo (UPF) –RS e ao professor Dr. Vandrê Barbosa Brião, integrante do corpo docente da Instituição referida, pelo acolhimento e conhecimento compartilhado. Também aos acadêmicos, Bruna Seguenka, Patrícia Costa da Silva, Vinicius Castoldi e Augusto Hemkemeier, pelo auxílio e dedicação.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural - CEBIME Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, pela concessão da análise em MALDI-TOF e à Dra. Martina Blank, pela cooperação.

A todos, obrigada por permitirem que esta tese se tornasse realidade.

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Concentração de soro de leite ovino por ultrafiltração e diafiltração para hidrólise enzimática e obtenção de peptídeos bioativos

Daiane Preci

Junho de 2018

Orientadoras: Dra. Juliana Steffens

Dra. Clarice Steffens

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi concentrar e diafiltrar o soro de leite ovino em membrana de ultrafiltração, caracterizá-lo quanto as suas propriedades químicas e funcionais. Averiguar a atividade enzimática da protease corolase H-pH, analisar a condição de pH e temperatura para obter a maior atividade enzimática e verificar a melhor concentração de enzima (1 e 10%). Investigar a hidrólise do concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD) solução 10% (p/v) em tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h e as atividades antimicrobiana e antioxidante. Além disso, avaliar o perfil peptídico, do hidrolisado que se destacasse frente as propriedades investigadas. O processo ultrafiltração (UF) associado ao processo de diafiltração (DF) em membrana de 10kDa na concentração de soro de leite ovino, incrementou em aproximadamente duas vezes o conteúdo de proteína total (84.30%) e favoreceu o incremento no percentual proteína solúvel em 11.90%, além de reduzir os teores de lactose e de melhorar as propriedades funcionais conferindo uma emulsão mais estável. A protease corolase H-pH apresentou atividade enzimática de 482 U/mL em pH 8 e 60°C obteve-se a maior atividade. O uso de 10% de enzima, incrementou apenas 9.0% no grau de hidrólise, por esta razão, optou-se por conduzir os testes com a menor concentração enzimática (1%). Embora todos os tempos de hidrólise tenham apresentado atividade antioxidante (IC₅₀ 1.32 a 1.56 mg/mL) e antimicrobiana frente a bactérias Gram-positiva (*Listéria monocytogenes*) e Gram-negativa (*Salmonella choleraesuis*) com faixa de concentração inibitória mínima (CIM) de 5 a 20 mg/mL, o tempo de 1h apresentou melhores resultados. O hidrolisado em 1h de reação em relação ao tempo de 5h apresentou o maior número de péptidos em intervalo de 300 a 500m/z (23.28%), também foram encontrados maiores percentuais de péptidos em faixa de 4.000m/z (13.77%) e 5.000m/z (4,59%) comparado ao tempo de 5h de hidrólise que apresentou

valores de 11.99 e 1.75%, respectivamente. Além disso, peptídeos ≥ 12.000 m/z foram reduzidos em 49,04% em tempo de hidrólise de 5h. Nas faixas mencionadas, o número de peptídeos foi superior em 1h de hidrólise e poderiam estar relacionados ao destaque frente as propriedades bioativas investigadas. As diferenças na distribuição do número de peptídeos em toda faixa investigada (300 – 20.000 m/z) em MALDI-TOF, foi alterada com o tempo de hidrólise, o que pode ter contribuído para degradação das sequências péptidas ativas das moléculas. A protease corolase H-pH apresentou-se eficiente na hidrólise das soro proteínas β -Lg e α -La já na 1ª hora de reação. O concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (solução 10% (p/v) em 60°C, pH 8,0) hidrolisado com enzima corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em 1 h de reação, é recomendado como ideal para a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante e antimicrobiana frente a *Salmonella choleraesuis* e a *Listéria monocytogenes*.

Palavras-chave: hidrólise, proteínas, antioxidante, antimicrobiano, soro de leite ovino, propriedades funcionais, peptídeos.

Abstract: The objective of the present study was to concentrate and diafilter the sheep milk whey on ultrafiltration membrane, to characterize it as to its chemical and functional properties. To verify the antioxidant activity of the protease corolase H-pH, to analyze the best condition of pH and temperature to obtain the highest enzymatic activity and to verify the best concentration of enzyme (1 and 10%). To investigate the hydrolysis of diafiltered sheep whey protein concentrate (CPSLOD) solution 10% (p/v) at times of 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours and antimicrobial and antioxidant activities. In addition, to evaluate the peptide profile of the hydrolyzate that stood out against the investigated properties. The ultrafiltration (UF) process associated with the diafiltration process (DF) in 10kDa membrane in sheep serum concentration increased approximately twice the total protein content (84.30%) and favored the increase in the percent soluble protein in 11.90%, in addition to reducing the lactose contents and improving the functional properties giving a more stable emulsion. The pure protease presented enzymatic activity of 482 U/mL and at pH 8 and 60 ° C the highest activity was obtained. The use of 10% of enzyme, increased only 9.0% in the degree of hydrolysis, for this reason, it was decided to conduct the tests with the lowest enzyme concentration (1%). Although all the hydrolysis times presented antioxidant activity (IC 50 1.32 to 1.56 mg/mL) and antimicrobial activity against Gram-positive (*Listéria monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*Salmonella choleraesuis*) with minimum inhibitory concentration range MIC) of 5 to 20 mg/mL, the time of 1h presented better results. The hydrolyzate in 1h reaction with respect to the time of 5h had the highest number of peptides in the range of 300 to 500 m/z (23.28%), also the highest percentages of peptides were found in the range of 4.000 m/z (13.77%) and 5.000 m/z (4.59%) compared to the 5 hours hydrolysis time, which presented values of 11.99 and 1.75%, respectively. In addition, peptides ≥ 12.000 m/z were reduced by 49.04% at a hydrolysis time of 5h. In the mentioned bands, the number of peptides was higher in 1h of hydrolysis and could be related to the prominence against the bioactive properties investigated. Differences in the distribution of the peptide number in the entire investigated range (300-20.000 m/z) in MALDI-TOF were altered with the hydrolysis time, which may have contributed to the degradation of the active peptide sequences of the molecules. The protease corolase H-pH was efficient in the hydrolysis of serum proteins β -Lg and α -La in the first hour of reaction. The diafiltered sheep whey protein concentrate (10% (p/v) solution at 60°C, pH 8.0) hydrolyzed with corolase H-pH enzyme (1% based on protein content) in 1 hour of reaction, is recommended as an ideal for obtaining peptides with antioxidant and antimicrobial activity against *Salmonella choleraesuis* and *Listéria monocytogenes*.

Key words: hydrolysis, proteins, antioxidant, antimicrobial, sheep's milk, functional properties, peptides.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Soro de Leite.....	4
2.1.1 Proteínas do soro.....	6
2.2 Hidrólise das proteínas	10
2.2.1 Enzimas	10
2.3 Compostos bioativos.....	12
2.3.1 Peptídeos Antioxidantes	14
2.3.2 Peptídeos Antimicrobianos	15
2.4 Processo de Separação com membranas	17
2.4.1 Membranas de UF	18
2.4.2 Princípios de operação das membranas.....	21
2.4.3 Fatores limitantes dos processos de separação por membranas.....	21
2.5 Considerações Finais: Estudo da Arte	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Soro de leite ovino	24
3.2 Concentrado proteico de soro de leite ovino.....	24
3.3 Concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado	26
3.4 Atividade Enzimática.....	27
3.5 Hidrólise Enzimática.....	29
3.6 Teste de Inativação Enzimática	29
3.7 Grau de Hidrólise	30
3.8 Caracterização do Soro de Leite Ovino e das Frações da UF e da UF/DF.	31
3.9 Determinação de propriedades funcionais das frações concentradas da UF e UF/DF	34
3.9.1 Solubilidade proteica.....	34
3.9.2 Índice de atividade emulsificante	35
3.10 Determinação das propriedades biológicas dos hidrolisados	36
3.10.1 Atividade antioxidante.....	36
3.10.2 Atividade antimicrobiana.....	37
3.11 Determinação de Peptídeos Bioativos	38

3.12 Tratamento dos dados	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Fluxo de permeado da membrana de UF	40
4.2 Características físico-químicas do soro de leite ovino desnatado e físico-químicas e funcionais das frações da UF e da UF/DF	41
4.3 Atividade enzimática	51
4.4 Grau de hidrólise (GH%) da protease corolase H-pH em diferentes concentrações.....	52
4.5 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática da protease corolase H-pH.....	52
4.6 Grau de hidrólise, atividades antimicrobianas e antioxidantes.....	54
4.7 Frações proteicas dos hidrolisados.....	60
4.8 Perfil peptídico dos hidrolisados.....	62
5 CONCLUSÃO.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do sistema de membrana de UF de 10kDa.....	25
Figura 2 – Microplaca de microtitulação (ELISA) com 96 poços (a); Leitora Elisa Thermo Plate (b).....	37
Figura 3 – Fluxos de permeado para membrana de 10kDa a 2 bar para água e soro de leite ovino, para as etapas de UF e DF.....	40
Figura 4 – Imagem do CPSLO e do CPSLOD.....	44
Figura 5 – Imagem dos permeados UFP, DFP ₁ , DFP ₂ e DFP ₃	49
Figura 6 – Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>) para as amostras de soro, concentrado e permeado da UF e concentrado e permeados da DF. Da esquerda para a direita: Coluna 1: marcador de massa molar; coluna 2: SLO; coluna 3: CPSLO; coluna 4: CPSLOP; coluna 5: UFP; coluna 6: DFP ₁ ; coluna 7: DFP ₂ ; coluna 8: DFP ₃	49
Figura 7 – Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a atividade enzimática da corolase H-pH em 1 h de incubação obtidos do planejamento fatorial 2 ²	53
Figura 8 – Concentração de hidrolisado (1,2,3,4,5 e 6 h) necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC ₅₀).....	59
Figura 9 – Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>) para as amostras dos hidrolisados (1, 2, 3, 4, 5, e 6 horas) a partir da solução 10% (m/v) do CPSLO diluído em tampão Tris-HCl (pH 8,0) e percentual de enzima H-pH de 1%. Da esquerda para a direita: Coluna 1: marcador de massa molar; coluna 2: 1 h de hidrólise; coluna 3: 2 h de hidrólise; coluna 4: 3 h de hidrólise; coluna 5: 4 h de hidrólise; coluna 6: 5 h de hidrólise; coluna 7: 6 h de hidrólise.....	61
Figura 10 – Percentagem peptídeos no intervalo de 300-20.000m/z para 1h e 5h de hidrólise.....	63
Figura 11 – Percentagem peptídeos >10.000m/z para 1h e 5h de hidrólise.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de soro de leite bovino e ovino.....	5
Tabela 2 – Concentração das principais proteínas de soro de leite bovino, ovino e caprino.....	7
Tabela 3 – Processo de separação por membranas comerciais e suas aplicações.....	18
Tabela 4 – Níveis e variáveis utilizados no planejamento 2 ² para avaliação da atividade enzimática.....	28
Tabela 5 – Valores médios de pH, condutividade elétrica, sólidos totais, proteína, lactose, gordura, cinzas, Cor L* a* b* para soro de leite ovino desnatado (SLOD), concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO) e concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD).....	42
Tabela 6 – Resultados dos teores de proteína, lactose e cinzas para UFP, DFP ₁ , DFP ₂ e DFP ₃	48
Tabela 7 – Valores de proteína total, proteína solúvel, K ₁ e K ₂ para o CPSLO e CPSLOD.....	50
Tabela 8 – Matriz do planejamento fatorial 2 ² e resposta em termos de atividade enzimática (U/mL) em função do tempo de incubação.....	53
Tabela 9 – Grau de hidrólise, atividade antimicrobiana da protease (corolase H-pH) em diferentes tempos.....	54
Tabela 10 – Atividade antioxidante da protease (corolase H-pH) em diferentes concentrações de hidrolisado e relação aos tempos de hidrólise.....	58
Tabela 11 – Massa molecular média e comprimento médio da cadeia peptídica das amostras em diferentes tempos de hidrólise.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Análises realizadas nas amostras de soro de leite ovino (SLO), nas amostras de soro de leite ovino desnatado (SLOD), concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO), concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD), permeado da UF (UFP), permeado da primeira DF (PD1), permeado da segunda DF (PD2), permeado da terceira DF (PD3), hidrolisado do concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD-H).....	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Ácido bicinconínico
BHA	2,3-terc-butil-4-hidroxianisol
BSA	Albumina de soro bovina
C	Croma
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPS	Concentrado proteico de soro de leite
CPSLO	Concentrado proteico de soro de leite ovino
CPSLBD	Concentrado proteico de soro de leite bovino diafiltrado
CPSLOD	Concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado
Cu	Cobre
CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
Cys	Cysteína
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DF	Diafiltração
DFP₁	Primeiro permeado da diafiltração
DFP₂	Segundo permeado da diafiltração
DFP₃	Terceiro permeado da diafiltração
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH	Difenilpicrilhidrazina
EC₅₀	Coeficiente de inibição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FC	Fator de concentração
GH	Grau de Hidrólise
HCl	Ácido clorídrico
H₂O	Água destilada

Ig	Imunoglobulina
IPS	Isolado proteico de soro de leite
IS	Índice de solubilidade
KNaC₄H₄O₆	Tartarato de sódio e potássio
L*	Luminosidade
LB	Lúria Bentani
Lf	Lactoferrina
L-Tyr	L-tirosina
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight
MF	Microfiltração
MM	Massa molar
MS/MS	Massa/Massa
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF	Nanofiltração
OI	Osmose inversa
ORAC-FL	Oxygen radical absorbance capacity
PI	Ponto isoelétrico
PSM	Processos de separação por membranas
RD	Retrodispersão
RDC	Resolução
RP- FPLC	Reversed-phase fast protein liquid chromatography
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio e poliacrilamida
SLB	Soro de leite bovino
SLO	Soro de leite ovino
SLOD	Soro de leite ovino desnatado
T	Transmitância
TCA	Ácido tricloroacético
TMP	Transmembrane Pressure
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano cloridrato
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

Tyr	Tirosina
UF	Ultrafiltração
UFP	Permeado da Ultrafiltração
WP	Whey protein
α-La	Alfa-lactoalbumina
β-Lg	Beta-lactoglobulina

1 INTRODUÇÃO

O soro de leite é a fração líquida resultante da coagulação do leite e remoção de caseína na fabricação de queijo. Durante a produção do queijo 85 a 90 % do volume total é soro de leite, o qual contém, em torno de 55 % dos nutrientes do leite incluindo proteínas de alto valor biológico, lactose, vitaminas solúveis e minerais (ANTUNES, 2003; ATRA et al., 2005). Em comparação ao soro de leite bovino, o soro de leite ovino apresenta maior conteúdo proteico e corresponde em média a 20 % do total das proteínas encontradas no leite. Dentre as proteínas presentes em soro de leite encontram-se a beta-lactoglobulina (β -Lg) e a alfa-lactoalbumina (α -La), as quais correspondem a 70% das proteínas presentes e são as principais responsáveis pelas propriedades biológicas e funcionais, tais como capacidade emulsificante, formação de espuma, solubilidade, entre outros (TRONCO, 2013).

No entanto, os fatores que dificultam o aproveitamento do soro são os elevados conteúdos de água, lactose e sais. Uma alternativa para a concentração do soro é o uso da ultrafiltração (UF), pois tem-se apresentado eficiente na preservação das propriedades proteicas do soro em virtude de não necessitar do uso de temperaturas elevadas. O emprego do processo de diafiltração, associado à ultrafiltração, tem contribuído para a redução nos teores de lactose e incremento no percentual de proteína (TSAKALI et al., 2015).

As proteínas são nutricionalmente importantes devido ao fornecimento de aminoácidos essenciais (PIRES et al., 2006). Na ingestão de proteínas, os aminoácidos primários são hidrolisados por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal e liberam os chamados aminoácidos incomuns, fragmentos denominados de peptídeos bioativos, os quais estão criptografados dentro das proteínas do soro de leite e encontram-se inativos até a sua liberação (HERNÁNDEZ-LEDESMA, RAMOS e GOMES-RUIZ, 2011; JEEWANTHIKIM et al., 2017). Peptídeos bioativos podem ser definidos como componentes alimentares que independente das suas funções nutritivas desempenhe uma atividade de regulação no organismo humano (GOBBETTI, MINERVINI, e RIZZELLO, 2004). Estudos revelam que um incremento na atividade biológica pode ser constatada após a hidrólise das proteínas por via química, processo fermentativo ou tratamento enzimático (VAN DER VEM et al., 2002;

HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005; PENÃS et al., 2006; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2006; HERNÁNDEZ-LEDESMA, RAMOS e GOMES-RUIZ, 2011; CORRÊA et al., 2014; JEEWANTHIKIM et al., 2017). A aplicação de enzimas tem apresentado maiores benefícios em detrimento ao uso de ácidos e bases, em virtude da preservação de aminoácidos, não exigência de remoção do sistema e por requererem quantidades menores para atuação. Além disso, hidrolisados proteicos a partir de enzimas, tem melhorado as propriedades nutricionais e funcionais (PACHECO et al., 2005; PAGNO et al., 2009; SILVA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013).

Propriedades multifuncionais de peptídeos podem ser encontradas em diferentes matérias primas proteicas. Atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante podem ser reconhecidas isoladamente ou atuarem sinergicamente como resposta para a obtenção de mais de uma atividade reguladora. Os peptídeos derivados de soro de leite ovino podem apresentar atividades biológicas devido a homologia entre as proteínas bovinas, apesar disso, poucos peptídeos liberados a partir deste soro tem sido relatados (BAKER et. al., 2000 HERNÁNDEZ-LEDESMA, RAMOS e GOMES-RUIZ, 2011).

Frente a essas características a utilização de soro de leite ovino no setor alimentício poderia propiciar a agregação de valor através de sua incorporação como ingrediente. Pesquisas envolvendo essa temática voltada ao soro de leite da espécie ovina ainda são escassas quando comparadas ao número de pesquisas em concentrados de soro de leite bovino.

Nesse contexto, o objetivo geral do presente estudo foi concentrar e diafiltrar o soro de leite ovino em membrana de ultrafiltração, caracterizá-lo quanto a características químicas e funcionais, além de submeter o concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado a hidrólise enzimática (corolase H-pH) e avaliar potencial antioxidante, antimicrobiano e o perfil peptídico dos hidrolisados. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Concentrar e diafiltrar o soro de leite ovino utilizando membrana espiral de ultrafiltração de 10kDa, pressão de 2 bar e fator de concentração (FC) 8.
- Caracterizar o soro de leite ovino (SLO), o concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO) e o concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD), quanto ao conteúdo proteico, frações proteicas

(eletroforese), lipídico, lactose, cinzas, sólidos totais, umidade, pH, condutividade e cor.

- Determinar as propriedades funcionais (solubilidade e emulsificação) do CPSLO e do CPSLOD.
- Avaliar as frações proteicas (eletroforese) do permeado do processos de ultrafiltração (UF) e diafiltração (DF), conteúdo proteico, lactose e cinzas
- Mensurar a atividade enzimática da protease comercial, corolase H-pH.
- Investigar o efeito do pH e temperatura, por meio de um planejamento fatorial completo 2², na atividade enzimática da protease (corolase H-pH) do CPSLOD.
- Estudar o grau de hidrólise da proteína do CPSLOD (solução 10% p/v) com 1 e 10% (baseado no conteúdo proteico) de enzima, corolase H-pH.
- Avaliar o grau de hidrólise e a capacidade antioxidante e antimicrobiana em diferentes tempos de reação (1, 2, 3, 4, 5, e 6 h).
- Determinar qualitativamente o perfil peptídico do hidrolisado que se destacou frente a atividade antimicrobiana e antioxidante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item, serão apresentados aspectos teóricos sobre a composição do soro de leite ovino, processos de separação por membranas (PSM) com ênfase no processo de ultrafiltração (UF) empregado neste trabalho e algumas propriedades biológicas dos compostos bioativos.

2.1 Soro de Leite

De acordo com a Portaria Nº 53, de 10 de abril de 2013, o soro de leite é definido como sendo produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos, caseína e produtos similares, podendo apresentar-se na forma líquida, concentrada ou em pó. Em caso de coagulação enzimática, o pH do soro deverá encontrar-se na faixa de 6,0 a 6,8, enquanto que na coagulação por acidificação, deverá apresentar-se abaixo de 6,0. Na designação do soro de leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2013).

A Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ) em uma matéria publicada em julho 2015 apresentou dados do *Euromonitor International* para o mercado de queijos com projeções positivas para o Brasil, o qual deve aumentar em três vezes as vendas entre 2010 e 2020 alcançando valores de 9,9 bilhões de dólares, com esse avanço, o Brasil ultrapassaria a Itália e ocuparia o quinto lugar do mercado mundial de queijo (ABIQ, 2015).

Devido ao volume de soro gerado no processo de produção de queijos, o mesmo passa a ser o principal co-produto da indústria de laticínios. Sua importância nutricional está relacionada aos percentuais de nutrientes correspondendo a 50% dos nutrientes presentes no leite (CAVALLI et al., 2008; STUBBS, ABUD, e BENCINI, 2009).

Diferenças na composição do soro de leite ovino e bovino podem ser observadas na Tabela 1, onde o soro proveniente do leite ovino apresenta teores médios de proteína, gordura, lactose e minerais bem como de sólidos totais superiores aos do soro de leite bovino.

Tabela 1 – Composição de soro de leite bovino e ovino.

Componente	Ovino	Bovino
Sólidos Totais (%)	6,1 – 7,6	5,8 – 6,5
Gordura (%)	0,35 – 0,4	0,2 – 0,25
Proteínas do soro (%)	0,8 – 1,3	0,6 – 0,8
Lactose (%)	4,2 – 5,0	4,4 – 4,5
Minerais (%)	0,6 – 0,9	0,5 – 0,8

Fonte: Adaptado de Antunes (2003); Hernández-Ledesma, Ramos e Gomes-Ruiz (2011); Abreu (2014).

O soro de leite por ser rico em nutrientes, quando lançado no meio ambiente sem tratamento prévio causa impacto ambiental devido à elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (MACHADO et al., 2000). Por suas características nutricionais, o soro, seja bovino, ovino ou caprino, é passível de ser empregado na produção de lácteos, como bebidas lácteas e sorvetes a fim de enriquecer esses produtos e ainda contribuir para a supressão de resíduos no meio ambiente (TASHIMA et al., 2013). Para Cassanego et al. (2012) a aplicação de soro de leite em alimentos mostra-se propício frente ao cenário de aumento do consumo de alimentos saudáveis pela população e a busca incessante das indústrias alimentícias pela diminuição de custos de operação e produção.

Dentre os constituintes do soro de leite mais relevantes, destacam-se as proteínas, as quais apresentam propriedades funcionais, como formação de espuma, emulsificação e solubilidade (PAGNO et al., 2009). O autor ainda destaca que etapas de concentração de soro de leite líquido poderiam realçar essas propriedades, visto que o processo acarreta no aumento dos percentuais de proteína. Segundo Giralzo-Zuñiga et al. (2004), o soro de leite na indústria de alimentos pode ser empregado objetivando-se diversas características, as quais variam desde melhorias na qualidade nutricional, como aumento da viscosidade em molhos para saladas e sopas, melhorias de textura em massas tipo macarrão e produtos lácteos dentre eles, sobremesas e iogurtes e capacidade de aeração em bolos e produtos de confeitaria, dentre outras características funcionais. Salienta o autor, que a variedade de funções desempenhadas pela adição de soro de leite a diversidades dos produtos onde o mesmo pode ser empregado

pode estar relacionada à sua elevada solubilidade quando comparados ao caseinato de sódio e às proteínas da soja.

2.1.1 Proteínas do soro

A palavra proteína originou-se da palavra grega *protos* que significa “a primeira” ou a “mais importante”. Essas macromoléculas biológicas ocorrem desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com peso moleculares da faixa de milhões (LEHNINGER, 2006). Assim como os carboidratos e os lipídeos, as proteínas são macromoléculas, promotoras de energia para o organismo, regulam vários processos metabólicos, agem como reparadores celulares, na construção e reparação de músculos e ossos (ANTUNES, 2003).

As proteínas são formadas por unidades de aminoácidos, os quais se dividem em dois grupos; os não essenciais, ou seja, que podem ser sintetizados pelo organismo, e os essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), os quais devem ser obtidos através da dieta (ANTUNES, 2003). As proteínas são constituídas de 22 aminoácidos, com cadeias laterais distintas, a qual determina suas propriedades químicas, esses aminoácidos estão ligados covalentemente em sequências lineares diversas e em muitas combinações, conferindo propriedades e atividades extraordinariamente diferentes (LEHNINGER, 2006). Distintas combinações e sequências de aminoácidos resultam na formação de moléculas com funções diferentes como os anticorpos, hormônios, proteínas do leite, entre outros.

Assim como no leite, a composição do soro pode sofrer variações em decorrência da dieta do animal, raça, estágio de lactação, dentre outros fatores citados anteriormente (HAENLEIN e WENDORFF, 2006; CORTEZ, 2013; FAVA, 2012). Para Hernández-Ledesma et al. (2011) em soro de leite a composição proteica ainda depende do tipo de soro; ácido ou doce, em que o soro de leite bovino doce apresenta percentual de proteína de 0,8% e soro ácido de 0,75%. De acordo com Salzano (2002) as proteínas encontradas no soro representam em torno de 20% do total das proteínas encontradas no leite.

As proteínas encontradas no leite dividem-se em duas frações, as proteínas do soro de leite e as caseínas (SALZANO, 2002). Uma faixa variando

entre 76 e 83% de caseína pode ser encontrada para o leite ovino (RAMOS e JUAREZ, 2011). As proteínas do soro em relação a caseína apresentam vantagem quanto a desnaturação, sendo menos sucessíveis diante de ácidos estomacais, preservando suas propriedades funcionais (PACHECO et al., 2005; RENHE, 2008).

Dentre as proteínas do soro de leite ovino e bovino encontram-se em maior quantidade a β -Lg e a α -La (POLTRONIERI, CAPPELLO e D'URSO, 2012). Atribui-se as mesmas como principais responsáveis pela capacidade de formação de emulsões, espuma, geleificação e capacidade de hidratação de grande importância para os alimentos (ANTUNES, 2003). As concentrações das principais proteínas de soro de leite para diferentes espécies podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração das principais proteínas de soro de leite bovino, ovino e caprino.

Proteínas	Concentração (g/L)		
	Bovino	Ovino	Caprino
Proteínas totais do soro de leite	5,0-9,0	8,8-10,4	3,7-7,0
β -lactoglobulina	3,2-4,0	2,7-5,0	1,8-2,8
α -lactoalbumina	1,2-1,5	1,2-2,6	0,6-1,1
Albumina do soro	0,3-0,6	0,5-0,6	0,26-0,3
Lactoferrina	0,05-0,2	0,10	0,12

Fonte: Storry et al., (1983), Hahn et al., (1998), Fox et al., (2000) apud Hernández-Ledesma, Ramos e Gomes-Ruiz, (2011).

Assim como no soro de leite bovino, em soro ovino, além das proteínas majoritárias; β -Lg e α -La, encontram-se as imunoglobulinas (Ig), albumina do soro e lactoferrina (Lf) em menor proporção (ANTUNES, 2003; CORRÊA et al., 2014). As proteínas do soro de leite ovino utilizando-se proteases são atribuídas propriedades antioxidantes (CORRÊA et al., 2014; WELSH et al., 2017). Estudo recente, revelou, que ratos alimentados com a dieta comercial padrão (milho, farelo de soja, cevada, farelo, pasta de leite, melaço) mais proteína de soro de ovelha/cabra (1 g/kg de peso corporal/dia) dissolvida em água potável, comparados aos ratos alimentados somente com a dieta padrão, apresentaram

um estado antioxidante optimizado com redução dos efeitos toxicos dos radicais livres tanto em lipídeos quanto em proteínas (KERASIOTI et al., 2018).

a) Beta-lactoglobulina- (β -Lg)

A β -Lg apresenta peso molecular de aproximadamente 18 kDa (POPPI e COSTA, 2010). Corresponde a 74% de soro de leite ovino (3,7 g/ L), 65% em bovino (3,2 g/ L) e não está presente no leite humano nem no leite de camelo (YADA, 2004; POLTRONIERI, CAPPELLO e D`URSO, 2012). Salientam-se diferenças quanto a sequência aminoacídica entre  $\beta$ -Lg de ovinos e bovinos (POLTRONIERI, CAPPELLO e D`URSO, 2012). A β -Lg entre as espécies varia também quanto a digestibilidade, sendo extremamete sensível à proteólise por pepsina em ovinos e resistente em bovinos (EL-ZAHAR et al., 2005; POLTRONIERI, CAPPELLO e D`URSO, 2012). Em virtude da grande concentração desta proteína no soro de leite bovino, as propriedades desta proteína em grande extensão, são vistas como as propriedades dos concentrados proteicos de soro (YADA, 2004). Atividade bactericida foi encontrada após a digestão proteolítica da β -Lg bovina (PELLEGRINI et al., 2001; HAQUE e CHAND, 2008). Pesquisas envolvendo hidrólise de soro proteínas individuais em ovinos são escassas.

Trata-se de uma proteína de estrutura globular, sensível ao pH e a temperatura, dependendo do pH do meio e em valores acima de 70°C ocorre a sua desnaturação, o qual dependerá do tempo de exposição (ANTUNES, 2003). O leite quando aquecido em temperaturas em torno de 75°C, desnatura-se, pois a β -Lg passa a expor seu grupo sulfídrico, antes protegido na molécula, o qual reage com a caseína e possivelmente com a α -La, causando alterações em algumas propriedades do leite (FOX e MCSWEENEY, 1998). De acordo com De Wit (1998), existe uma relação entre pH e temperatura, em valores de pH superiores a 8,6, ocorre alterações nas propriedades físico-químicas da proteína, ocorrendo uma desnaturação irreversível. Enquanto, em pH neutro e temperaturas de até 70°C a desnaturação é reversível e em pH de até 8,6 e temperaturas superiores a 80°C a estrutura nativa das proteínas não é alterada.

Apresenta resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas do

estômago, sendo assim um importante carreador de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote em animais (HARAGUCHI, ABREU e DE PAULA, 2006).

b) Alfa-lactoalbumina - (α -La)

A α -La conhecida como segunda mais abundante proteína encontrado no soro de leite, representa em média 15% das proteínas presentes no soro de leite ovino e bovino em conteúdo de 1,2 g/ L em ambas as espécies (POLTRONIERI, CAPPELLO e D`URSO, 2012). Apresenta peso molecular de 14 kDa e dentre todas as fontes proteicas alimentares é o peptídeo de maior teor de triptofano (6%) e o principal do leite humano (ANTUNES, 2003).

Esta proteína apresenta-se principalmente na estrutura globular quase esférica, compacta em meio neutro e alcalino. Também apresenta importância na síntese de lactose, pela interação da mesma com a enzima galactose transferase (WONG, CARMIRAND, e PAVLAT, 1996). Uma mudança na estrutura da proteína α -La, com liberação do íon Ca^{2+} , desnaturação reversível e um processo de agregação ocorre em situações de meios acidificados, em pH inferiores a 5,0, com acentuação em temperaturas próximas aos 55°C (DE WIT, 1998).

c) Outras proteínas

A albumina de soro possui massa molar de 69 kDa e não é sintetizada na glândula mamária, estando presente na circulação sanguínea (YADA, 2004). As imunoglobulinas (Ig) dividem-se em IgA, IgG e IgM e apresentam estruturas básicas semelhantes com cadeias leves de massas molares de 20 a 25 kDa e duas cadeias pesadas de 50 a 70 kDa. As imunoglobulinas são proteínas altamente solúveis em suas formas nativas (POLTRONIERI, CAPPELLO e D`URSO, 2012).

A lactoferrina é uma proteína que possui a propriedade de ligar-se ao ferro, cobre, manganês e zinco, e é produzida na glândula mamária (ANTUNES, 2003). A concentração dessa soro proteína está compreendida entre 100 a 200 mg/ L ovinos e bovinos, os quais compartilham de 90% da sequência aminoacídica. A lactoferricina, peptídeo originado a partir da hidrólise da

lactoferrina ovina, possui efeitos antibacterianos (RECIO E VISSER, 2000). Segundo Baker e Baker (2005), cada espécie pode apresentar suas particularidades em relação as propriedades deste peptídeo.

2.2 Hidrólise das proteínas

Os ácidos, bases e enzimas podem ser empregados como catalisadores na hidrólise de proteínas ou peptídeos. Os ácidos utilizados na hidrólise fornecem uma mistura de α -aminoácidos, em situações de total hidrólise, cada tipo de proteína fornece uma proporção ou mistura característica dos diferentes aminoácidos, observa-se também, que os 20 aminoácidos primários quase sempre se apresentam em quantidades diferentes em uma proteína (LEHNINGER, 2006). Diferente das enzimas, os ácidos e as bases podem destruir aminoácidos como a lisina, treonina e triptofano comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1986). Reed (1975) destaca que maiores concentrações de outros catalisadores em relação ao uso de enzimas, normalmente são necessários, além disso, as enzimas normalmente não precisam ser removidas do sistema.

Pacheco et al. (2005) destaca que o processo de hidrólise das proteínas têm sido aplicado no intuito de melhorar não somente as propriedades químicas, físicas e funcionais dos alimentos, mas também as características de absorção das proteínas, sem prejudicar o valor nutritivo. Atividades biológicas e funcionais importantes estão sendo investigadas em hidrolisados proteicos (ADJONU et al., 2013; PAGNO et al., 2009).

2.2.1 Enzimas

Enzimas são proteínas especializadas que atuam como eficientes catalisadores e aceleradores de reações, em caso de desnaturação, ou dissociação em subunidades a enzima provavelmente perderá a atividade catalítica (LEHNINGER, 2006). De acordo com o autor, poucos catalisadores não-biológicos apresentam grau de especificidade por seus substratos e atuam em soluções aquosas em temperatura e pH suaves assim como as enzimas.

Quanto ao tipo de reação, as proteases podem ser classificadas como endoprotease ou exoprotease dependendo do local de clivagem do substrato. Além disso, conforme o pH de atividade ótima, serão denominadas de neutras, ácidas ou alcalinas. Quanto à natureza química e mecanismo do sítio catalítico, poderão denominar-se de serino-protease, cisteína-protease, aspartil-protease, metaloprotease ou ainda de tipo catalítico desconhecido (RAO et al., 1998).

Reações de hidrólise proteica normalmente são catalisadas por enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases e proteinases. Enzimas proteolíticas classificam-se como hidrolases, por envolverem a água na hidrólise das proteínas, durante a reação ocorre a migração de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994). Microrganismos são utilizados com eficiência como fonte de proteases atuantes na hidrólise de leite desnatado e soro de leite e liberação de peptídeos bioativos (AHTESH et al., 2016).

Peptídeos bioativos com potencial antioxidante utilizando-se enzimas como catalisadores, foram investigados por Corrêa et al. (2014) a partir de soro de leite ovino, em soro de leite bovino por Adjonu et al. (2013). A hidrólise enzimática das proteínas do soro, α -La e β -Lg pelas enzimas pepsina, tripsina, quimotripsina e termolisina, apresentaram resultados satisfatórios para o emprego desses hidrolisados como antioxidantes em alimentos (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005). Isolados proteicos de soro de leite bovino utilizando as enzimas pepsina, tripsina e quimiotripsina, apresentados por Adjonu et al. (2013), demonstraram maior atividade antioxidante pela enzima quimiotripsina, seguido pela tripsina e a pepsina. Os autores ao investigarem o efeito do calor em suspensões de isolados proteicos a 37°C, constataram que o calor não afetou o padrão de hidrólise e conseqüentemente o tamanho dos péptidos formados durante a hidrólise com quimiotripsina. Proteínas com propriedades bioativas (caseinomacropeptídeo, imunoglobulina, lactoperoxidase, lactoferrina, α -lactalbumina e β -lactoglobulina) foram fracionadas a partir de soro de leite ovino e apresentaram rendimento e pureza razoáveis (PILBROW, BEKHIT E CARNE, 2016).

Welsh et al. (2017) constataram atividade antioxidante em peptídeos originados a partir da hidrólise de soro de leite ovino utilizando-se duas preparações de proteases (100 mg/mL), uma de origem bacteriana e outra de origem fúngica. As preparações (50 μ L) foram adicionadas ao soro de leite ovino

(1mL) e avaliadas em tempos de hidrólise de 1, 2 e 24 h a 45°C e apresentaram perfil peptídico distinto. Os autores, atribuíram essa diferença, a especificidade hidrolítica das proteases. Corrêa et al. (2014), ao investigar o soro de leite ovino (solução 10 g/L - pH 8,0) hidrolisado com a protease *Bacillus* sp.P7 (25 v/v) em temperatura de 45°C e tempos de reação de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 6 h, constataram atividade antioxidante que apresentou-se crescente de acordo com o aumento do tempo de reação.

Wakayabashi, Takase e Tomida (2003) constataram que a proteína lactoferrina após atuação da pepsina foi capaz de exercer atividade antimicrobiana frente alguns microrganismos como algumas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de fungos filamentosos. O potencial antimicrobiano de proteínas como lactoferrina e lactoperoxidase (presentes em soro de leite ovino) foram extraídas do colostro bovino e testadas em produtos de cuidados de saúde bucal incluindo géis e goma de mascar (TENOVUO, 2002). Peptídeos obtidos a partir de proteínas do soro de leite bovino também apresentam-se eficientes quanto a atividades antimicrobiana em sistema imunitário e demonstram-se estáveis durante a rota gastrointestinal (MADUREIRA et al., 2010). Orsi (2004) reconheceu atividade antimicrobiana com efeitos bacteriostático e bactericida a partir do péptido lactoferricina oriundo da lactoferrina bovina.

2.3 Compostos bioativos

As proteínas são polímeros formados pela desidratação de aminoácidos, estes são também conhecidos como aminoácidos primários, o processo inverso, ou seja, a liberação de aminoácidos pode ocorrer através da hidrólise dessas ligações covalentes. Os aminoácidos liberados pela hidrólise são designados de aminoácidos incomuns, por se tratarem de resíduos (perda de elementos químicos da água pela união de um aminoácido em outro) modificados no interior das proteínas. Estas modificações podem ocorrer pela simples adição de pequenos grupos químicos a certas cadeias laterais do aminoácido: hidroxilação, metilação, acetilação, carboxilação e fosforilação, ou pela adição de grupos maiores, como lipídeos e polímeros de carboidratos, ou ainda podem sofrer modificações nos grupos amina e carboxila livres nas extremidades N e C

terminais. Devido a estas modificações, os aminoácidos incomuns ou peptídeos, podem desempenhar, de maneira independente, diversas funções biológicas (LEHNINGER, 2006). Para um composto ser considerado bioativo, o mesmo deve exercer um efeito biológico afetando positivamente a saúde (MOLLER et al., 2008).

A hidrólise das proteínas podem liberar fragmentos denominados de peptídeos bioativos, os quais estão criptografados dentro das proteínas do soro de leite (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005). De acordo com Moller et al. (2008), peptídeos bioativos são gerados principalmente através da hidrólise enzimática de proteínas nativas, e/ou produzidos por processos fermentativos com culturas *starters*.

Pacheco e Antunes (2009), afirmam que para os peptídeos bioativos exercerem ação fisiológica, os mesmos devem apresentar-se íntegros após a passagem pelo sistema digestivo, ou seja, devem resistir à ação das peptidases, garantindo assim a sequência de seus aminoácidos. Madureira et al. (2010) destacam que após a ingestão de compostos bioativos, a presença desses compostos no lado luminal do trato gastrointestinal ou em órgãos periféricos, é importante para a comprovação da ação fisiológica *in vivo*.

Korhonen e Pihlanto (2006) destacam as proteínas do leite como a fonte de maior importância de peptídeos bioativos. Para Yadav et al. (2015), o valor proteico do concentrado de soro de leite associado aos processos; fermentativo e enzimático apresentam-se potencialmente atrativos na liberação de peptídeos bioativos e aplicáveis em produtos funcionais, nutricionais e terapêuticos. Corrêa et al. (2014), em sua investigação, constataram que o soro de queijo ovino pode ser um substrato adequado para liberação de compostos bioativos, através do emprego da protease de *Bacillus* sp., com potencial para utilização como ingrediente funcional em alimentos. Peptídeos bioativos foram liberados por hidrólise enzimática a partir de soro de leite bovino por Jeewanthikim et al. (2017) e em soro de leite ovino por Welsh et al. (2017). Hernández- Ledesma, Ramos e Gomes-Ruiz (2011), chamam atenção para os poucos relatos na literatura sobre a liberação de peptídeos em proteínas de soro ovino e caprino em comparação com as proteínas bovina.

A bioatividade da enzima protease S. na hidrólise de concentrado de soro de leite bovino hidrolisado em diferentes tempos de hidrólise (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 e

5 h), recebeu destaque frente as demais enzimas investigadas (alcalase, α -quimotripsina, pepsina, protease M. e tripsina) e teve a sua bioatividade associada a sua maior atividade proteolítica (JEEWANTHIKIM et al., 2017).

2.3.1 Peptídeos Antioxidantes

Uma das principais causas da deterioração de alimentos é atribuída à oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002). As reações de oxidação ocorrem quando elétrons são removidos de um átomo ou grupo de átomos, e para cada reação de oxidação, há uma reação de redução correspondente, envolvendo a adição de elétrons a um átomo ou grupo de átomos (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). A oxidação de lipídeos está entre as mais frequentes em alimentos e são causadas principalmente pelo oxigênio atmosférico. De acordo com Viljanen, Kivikari e Heinonen (2004), a oxidação lipídica exerce influência sobre a oxidação das proteínas, através da interação dos produtos oriundos da oxidação dos lipídeos com as proteínas.

Substâncias com a capacidade de sequestrar radicais livres podem ser obtidas de diversas fontes como alimentos e bebidas, exercendo papel antioxidante (ALVES et al., 2010). Dentre as definições existentes para atividade antioxidante, Roginsky e Lissi (2005) interpretam como sendo a capacidade de um composto em inibir a degradação oxidativa. Santos (2007), esclarece que esta atividade pode ser determinada pelo potencial antioxidante, o qual está intimamente associado à composição, propriedades e atividade biológica do material em estudo.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias básicas; antioxidantes sintéticos e naturais (HALL e CUPPET, 1997). Vários estudos estão sendo realizados para testar a influência da adição substâncias naturais com potencial de inibição de reações de oxidação em alimentos. Tem-se investigado a atividade antioxidante de peptídeos gerados a partir de processo de hidrólise de proteínas de soro de leite obtidos pelo emprego de diferentes enzimas. De acordo com Adjonu et al. (2013), hidrolisados de distintas enzimas podem exibir potencial antioxidante diferente, como é o caso da enzima quimotripsina que apresentou a maior capacidade antioxidante, seguido da tripsina e pepsina. Os autores sugerem que este potencial antioxidante possa estar relacionado com o

perfil dos pesos moleculares dos peptídeos gerados por cada enzima (dependentes da especificidade de cada enzima), que na quimotripsina apresentou maior variação, seguido da tripsina e pepsina.

Proteínas do soro de leite bovino, são geradas a partir da hidrólise de proteínas do soro com geração de peptídeos bioativos que apresentam distintas atividades, incluindo atividade antioxidante (BRANDELLI, DAROIT E CORRÊA, 2015). Assim como em soro de leite bovino, hidrolisados de soro de queijo ovino, também podem apresentar propriedades antioxidantes. Isso foi comprovado por Corrêa et al. (2014) que através da protease extraída da bactéria *Bacillus* sp. P7, isolada a partir de intestino de peixe da bacia amazônica, gerou peptídeos com propriedades antioxidantes. O autor assegurou em tempos mais prolongados de proteólise de soro de leite ovino, de 4 e 6 h, maiores percentuais de captura do radical livre ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), de 42,07 e 51,3%, respectivamente.

Hernández-Ledesma et al. (2005) produziram peptídeos bioativos através da proteólise de duas soro proteínas bovinas; α -La e da β -Lg, utilizando-se a enzima protease (corolase PP). Os quais apresentaram valores de atividade antioxidante por ORAC-FL (oxygen radical absorbance capacity) expressos em Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) da β -Lg de 2,62 μ mol equivalente de Trolox/ μ mol de peptídeo superiores ao antioxidante sintético BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) de 2,43 μ mol equivalente de Trolox/ μ mol de peptídeo, utilizado em alimentos. Os autores, constataram, que os permeados de 3 kDa dos hidrolisados gerados pela α -La e β -Lg, corresponderam a 71 e 85% atividade antioxidante, respectivamente.

2.3.2 Peptídeos Antimicrobianos

O crescimento microbiano associado a deteriorações enzimáticas e bioquímicas são responsáveis pelas alterações indesejáveis em alimentos. (DEVLIEGHERE, VERMEIREN e DEBEVERE, 2004). A fim de evitar as alterações promovidas por estes microrganismos em substituição aos antibióticos convencionais, Peters, Shirliff e Jabra-Rink (2010) destacam o crescente interesse sobre o potencial antimicrobiano de peptídeos, sendo uma das razões seu extenso espectro de atividade em oposição aos micro-

organismos; incluindo vírus, fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (YEUNG GELLATLY e HANCOCK 2011). Esses peptídeos antimicrobianos, segundo Giuliani, Pirri e Nicoletto (2007), são constituídos em número que variam de 6 a 100 resíduos de aminoácidos, os quais apresentam carga positiva e molécula anfipática, ou seja, possuem tanto regiões hidrofóbicas quanto hidrofílicas.

De acordo com Aoki e Ueda (2013), a atuação de peptídeos como antimicrobianos vem chamando a atenção pela eficiência em relação a bactérias, fungos e vírus. Dentre os peptídeos antimicrobianos apresentados pelos autores, encontra-se a lactoferricina, peptídeo derivado da lactoferrina. Em virtude da ascensão promovida pelo interesse sobre o assunto, em 2013 um banco de dados com informações sobre a atividade antimicrobiana de 3.904 peptídeos naturais e 1.643 peptídeos sintéticos passaram a ser disponibilizadas (ZHAO, HAIRONG e HUANG, 2013). Segundo Sgarbieri (2004) dentre as proteínas existentes no soro de leite bovino, a lactoferrina, lactoperoxidase, μ -lactalbumina e as imunoglobulinas apresentam atividade antimicrobiana.

Estudos de investigação envolvendo a presença de peptídeos bioativos em diferentes alimentos vem crescendo. A formação de peptídeos antimicrobianos foram encontrados por Fialho (2015) em queijo minas artesanal.

Hidrólise de proteínas do soro de leite bovino, são capazes de liberar peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana (BRANDELLI, DAROIT E CORRÊA, 2015). Extratos obtidos a partir de sete cogumelos comestíveis apresentaram atividade inibitória contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Estudos revelaram que bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* foram inibidas pelos peptídeos a partir da soro proteína α -La (LÖNNERDAL, 2003). Peptídeos biologicamente ativos, também, são originados a partir da β -Lg, dentre as contribuições biológicas encontra-se a função antimicrobiana (HERNÁNDEZ-LEDESMA, RECIO e AMIGO, 2008). O efeito antimicrobiano em soro de leite ovino foi revisado por Hernández-Ledesma, Ramos e Gomez-Ruiz (2011), salientando o aumento a nível mundial da produtividade do leite ovino e o potencial do soro de leite desta espécie frente ao fornecimento de compostos bioativos. Quanto a esta bioatividade, apenas uma pequena parcela destes peptídeos tem sido identificado e caracterizados (BENKERROUM, 2010).

2.4 Processo de Separação com membranas

As membranas podem ser definidas como um obstáculo semi-seletivo que permite a separação em duas fases, delimitando total ou parcialmente o transporte de uma ou mais espécies químicas presentes na fase, uma é conhecida como fase de alimentação na qual as substâncias ficam retidas e a outra como fase de permeado (MULDER, 1996).

Processos de separação por membranas (PSM) variam quanto a configuração podendo ser clássicas (tradicionais, convencionais ou transversal) e tangenciais (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006). A configuração clássica tende a reter as partículas na membrana ocasionando um aumento da resistência a filtração devido corrente de alimentação (suspensão ou solução) que ocorre perpendicularmente à membrana e paralelamente ao fluxo de permeado. Este escoamento apesar de ser menos complexo apresenta vida útil menor quando comparado ao escoamento tangencial (MULDER, 1996).

As membranas quando produzidas com material cerâmico, vítreo e metálico são classificadas como inorgânicas. Enquanto, que as membranas orgânicas utilizam materiais poliméricos sintéticos ou biológicos na sua composição. Membranas cerâmicas apresentam relevante resistência térmica, química e mecânica (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006). Porém, quando comparadas as membranas poliméricas apresentam custo elevado atribuído principalmente as suas matérias primas: alumina, zircônia, sílica e titânia, restringindo-se sua utilização a produtos de maior valor agregado e a processos de aplicação em menor escala. Por esta razão, membranas poliméricas são utilizadas em maioria. Diversos outros materiais utilizados como copolímeros; as celulosas modificadas, poliésteres, poliamidas, polissulfonas, apresentam elevada resistência a variações de pH e altas temperaturas (HABERT, BORGES e NOBREGA 2006).

Algumas características de permeados e aplicações das principais membranas utilizadas (microfiltração - MF, ultrafiltração - UF, nanofiltração - NF) e osmose inversa - OI) podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Processo de separação por membranas comerciais e suas aplicações.

Processo	Material que Permeia	Aplicações
Microfiltração (MF)	Água e sólidos dissolvidos.	Esterilização bacteriana; Clarificação de vinhos e cervejas; concentração de células; oxigenação de sangue.
Ultrafiltração (UF)	Água (solvente), sais solúveis de baixa massa molar.	Fracionamento/ Concentração de proteínas; recuperação de pigmentos/óleos.
Nanofiltração (NF)	Água, sais e moléculas de baixa massa molar.	Purificação de enzimas; bioreatores a membrana.
Osmose Inversa (OI)	Água (solvente).	Dessalinização de águas; concentração de frutas; desmineralização de águas.

Fonte: adaptado de Habert, Borges e Nóbrega (2006).

Com base na pressão a ser utilizada e na massa molar dos solutos a serem separados, as membranas são classificadas em diferentes categorias. Carvalho (2008), define a pressão aplicada em sistemas de filtração como sendo a força motriz do processo.

2.4.1 Membranas de UF

As membranas de UF operam por gradiente de pressão. Comercialmente apresentam-se especificadas por meio de sua massa molar de corte (MMC) estabelecida como a massa molar para a qual a membrana apresenta uma retenção igual a 95%, e a unidade comumente utilizada é o Dalton (Da). São eficientes no fracionamento e concentração de proteínas e recuperação de pigmentos e óleos (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006). A faixa utilizada em membranas ultrafiltrantes inserem-se além das proteínas, emulsões, polímeros, biomoléculas, colóides e gorduras (PEPPIN e ELLIOT, 2001). Permitem remover além de moléculas orgânicas com grande massa molecular,

alguns tipos de vírus e bactérias (EPA, 2001). Geralmente separam partículas de peso molecular entre 1 e 300kDa. Enquanto, que membranas de microfiltração separaram moléculas maiores entre 0,025-10 μ m (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

Membranas de UF apresentam porosidade entre 0,1 e 10%. Por apresentarem poros menores (1 a 100 nm) que as membranas de microfiltração (50 a 10000 nm), requerem a aplicação de pressões superiores (1 a 10 bar) as pressões aplicadas em sistemas de microfiltrações (0,1 a 2 bar) (MULDER, 1996).

Dentre as configurações de membranas existentes, encontram-se muitos tipos; tubular, enrolada ou em espiral, plana e de fibra oca (CHAUFER, MEIRELES-MASBERNAT e AIMAR 1998). Segundo Metcalf e Eddy (2003), esses distintos tipos podem ser utilizados em processos que envolvam baixas pressões. Com exceção da tubular, as demais constam nas categorias apresentadas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1996).

As membranas de UF podem ser empregadas no desenvolvimento de alimentos com baixo percentual de carboidratos, pois permitem reduzir o teor de lactose do leite e soro de leite, já que o carboidrato permeia pela membrana. Além disso, é possível realizar a separação das proteínas do leite e de soro de leite, conferindo a essas técnicas possíveis direcionamentos para novos usos de proteínas do leite, como ingredientes em sistemas alimentares (ANTUNES, 2003; BARBANO, 2009). De acordo com Bligh e Dyer (1959) a partir de reduções dos teores de lactose produtos com altos teores de proteínas podem ser obtidos.

Processos de concentração utilizando membranas de UF, também, podem atuar no modo de operação denominado de DF. O processo consiste na adição de água contínua ao concentrado da UF com o propósito de promover a retirada de massas molares inferiores ao tamanho de poro da membrana (YEE, WILEY e BAO, 2007). Em casos de concentração de soro de leite, a DF pode favorecer a saída de moléculas de lactose e minerais pela adição do solvente (água).

Concentrados proteicos de soro de leite (CPS) bovino existentes no mercado podem oscilar em 35 a 90% em relação ao conteúdo proteico (ANTUNES, 2003). Segundo o autor, CPS que apresentam 34 a 35% de

proteína, apresentam 53% de lactose, 4% de gordura e 8% de cinzas. Enquanto, os CPS com 50% de proteína, apresentam 35% de lactose e 5% de gordura e 7% de cinzas. O autor ainda destaca a possibilidade de aumento nos teores de proteínas (60-80%) através do emprego do processo de DF, em que CPS com 80% de proteínas apresentam 7% de lactose e gordura e cinzas de 4 a 7%. Para ele, o aumento na concentração proteica pode provocar reduções significativas nos níveis de lactose do concentrado. Diminuições nas concentrações de lactose e aumento nos valores das proteínas em amostras de soro de leite, também foram constatadas por Pagno et al. (2009) no emprego da técnica de UF associada a DF em membrana UF-6001, de polietersulfona em módulo aspiral e de massa molecular de 10 kDa, sendo o último processo responsável pela maior concentração de proteínas. Huffman (1996) afirma que adicionar-se água ao retido (processo de DF) de soro de leite, promove-se o aumento da concentração proteica.

Pagno et al. (2009), ao realizar a UF em modo DF, empregando-se três experimentos; 4 ciclos de DF (2 x 5L e 2 x 2,5L) totalizando 15L (volume total de água utilizado) e, 4 ciclos de DF (2 x 10L e 2 x 5L) totalizando 30L (volume total de água utilizado) e 6 ciclos de DF (6 x 5L) totalizando 30L (volume total de água utilizado), obteve valores de 56% de proteína e 31% de lactose para o primeiro experimento, 71% de proteína e 18% de lactose para o segundo experimento e 80% de proteína e 10% de lactose para o terceiro experimento, utilizando-se para todos o fator de concentração de seis (FC=6). Os autores constataram que volumes maiores de adição de água ao concentrado e maior número de ciclos de DF circulando no sistema contribuem para concentração de proteína, redução da lactose e redução de minerais.

Os concentrados de soro de leite com teores de 80% de β -LG e α -LA, estão sendo vendidos como ingredientes alimentares, obtidos através da separação da gordura do soro (cerca de 6,2% de matéria seca) por meio de UF, concentração por evaporação e secagem por pulverização, resultando em um pó de soro de leite com pouca lactose (BARBANO, 2009).

2.4.2 Princípios de operação das membranas

Uma variável importante no processo de separação por membrana (PSM) é o fluxo de permeado. Pode ser definido como a vazão (volumétrica, mássica ou molar) de permeado por unidade de área da membrana, ou seja, é o volume da solução alimentada que permeia através da membrana numa determinada área e tempo, sendo expressa geralmente em L/m^2h ou kg/m^2h (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

O fluxo de permeado depende das propriedades da membrana, das condições de operação, tais como a pressão aplicada, velocidade de escoamento tangencial, fator de concentração e também das características da solução a ser filtrada. O mesmo, também, é fortemente influenciado pela temperatura da solução de alimentação, pois o fluxo é função da viscosidade dinâmica da solução que, por sua vez, é função da temperatura. Assim, quanto maior a temperatura, menor a viscosidade e maior o fluxo de permeado. Outros parâmetros importantes que afetam o fluxo através das membranas são o pH e a força iônica, seus efeitos, porém, variam muito em função da solução de alimentação e da membrana utilizada (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

2.4.3 Fatores limitantes dos processos de separação por membranas

Em sistemas que empregam membranas de separação, o fluxo do permeado com o passar do tempo vai apresentando redução e ocorre independente do tempo. Porém, associa-se diretamente ao potencial de pressão aplicado e a difusão pelo material da membrana causando problemas em processos de filtração (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006). Fenômenos de polarização de concentração e incrustações (*fouling*), diâmetro de poro, fração da área de membrana ocupada por poros, espessura da membrana são relatados por Schneider e Tsutyia (2001) como sendo alguns dos responsáveis pela redução do fluxo do solvente através da membrana. O *fouling* ou colmatação da membrana é relatado como o maior inconveniente em processos de concentração e sua ocorrência está associada ao fenômeno de polarização por concentração, mas também dependerão do tipo de membrana e do tipo de solução a ser utilizada (HASAN, et al., 2013; GIACOBBO et al., 2010).

a) Polarização de Concentração

Fenômenos de polarização de concentração ocorrem em processos de filtração tangencial, na medida em que solutos vão sendo retidos pela membrana semi-permeável e passam a acumular-se na superfície, resultando em uma resistência adicional ao fluxo de permeado (solvente), além da gerada pela membrana (MULDER, 1996). Após o fenômeno de polarização de concentração ser constatado, devido à queda inevitável do fluxo de permeado no estágio inicial do processo de filtração, três fluxos passam a existir, dois deles surgem a montante; onde o fluxo convectivo de soluto ocorre no sentido da membrana e o outro fluxo difusivo ocorre da membrana para a solução e apenas um fluxo ocorre a jusante, o fluxo convectivo da membrana para a solução (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

Para Mulder (1996), situações em que o limite de solubilidade de soluções são ultrapassadas, o fenômeno de polarização pode facilitar não somente a ocorrência de precipitação de soluto, mas também o surgimento de incrustações por deposição. Segundo o autor, a polarização difere do fenômeno de depósito por não apresentar interações, entre o soluto e a membrana e redução reversíveis no fluxo. A reversibilidade da polarização pode ser obtida pela diminuição do gradiente de concentração através de mudanças nos parâmetros operacionais como; temperatura, pressão, agitação, velocidade de recirculação e concentração do fluxo de alimentação (CARVALHO, 2008; SHI, HANKINS e CITIS, 2014). As incrustações, também, podem ser removidas seguindo-se protocolo de limpeza química adequado (KILDUFF et al. 2000).

b) Incrustações (*Fouling*)

O *Fouling* ou incrustação ocorre após a estabilização da polarização de concentração, quando observa-se a queda contínua de fluxo de permeado, em virtude da formação de camada gel na superfície externa da membrana ou por interações físico-químicas, soluto-membrana no interior dos poros da mesma e pode ocorrer a precipitação de solutos (MULDER, 1996). Para Giacobbo et al. (2010) o aumento da resistência ao fluxo passa a ocorrer, tanto pelo bloqueio dos poros da membrana, quanto pela camada de incrustação acumulada na

superfície, diferindo da polarização de concentração que dificulta a passagem do permeado, por apresentar-se concentrado na região próxima da interface membrana/solução.

O decaimento do fluxo com o tempo é relatado como sendo uma problemática enfrentada em sistemas que envolvem o emprego de membranas (HASAN, et al., 2013; GIACOBBO et al., 2010; VIDAL e CAMPOS; 2009). Para Wibisono et al. (2014), as moléculas proteicas e conteúdo mineral do leite, quando submetido ao sistema de filtração são caracterizados como as principais causas da diminuição do fluxo por incrustação.

2.5 Considerações Finais: Estudo da Arte

Por meio da revisão da literatura foi verificado que o soro de leite ovino apresenta maior teor de proteínas em relação ao soro de leite bovino, o que o torna um atrativo para estudos na utilização destas proteínas. A concentração de proteínas pode ser realizada por meio do processo de separação por membranas e incrementada pelo processo de diafiltração. As características físico-químicas e as atividades biológicas do soro de leite bovino são bastante exploradas, enquanto que de soro de leite ovino ainda carecem de estudos. Como destacado por Hernández-Ledesma, Ramos e Gomez-Ruiz (2011) acredita-se que pela semelhança entre as estruturas primárias das proteínas bovinas e ovinas, o soro de leite oriundo de ovelhas, também, possa apresentar potencial bioativo a partir de seus peptídeos.

Investigações quanto ao potencial antioxidante e antimicrobiano de peptídeos obtidos a partir da hidrólise por protease de concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado apresentaram potenciais de aplicação em alimentos, visto que, o soro de leite é um coproduto abundante na indústria de laticínios e interessante não somente pelo seu valor nutricional, mas também pela funcionalidade e potencial bioativo das proteínas e seus peptídeos podendo ser vistos como excelentes perspectivas no mercado emergente de produtos lácteos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soro de leite ovino

A matéria prima utilizada no presente estudo foi soro de leite de ovelha, da raça Lacaúne, oriundo da elaboração de queijo colonial, cedido pela empresa Gran Paladare, localizada na cidade de Chapecó, SC. O soro foi transportado até o laboratório do SENAI – Chapecó, sob refrigeração a 4°C em tarros devidamente higienizados e esterilizados com capacidade para 50 L. O soro foi desnatado (gordura $\cong$ 1% em base seca) em desnatadeira (Casa das Desnatadeiras, modelo 09 GR Inox) e pasteurizado em pasteurizador de placas (Sotronic, modelo ST-SOTROLEITE) a 75 °C/15 s, resfriado a 4°C em tanque inox (Sotronic, modelo ST-RLE) e armazenado a 2°C em câmara fria.

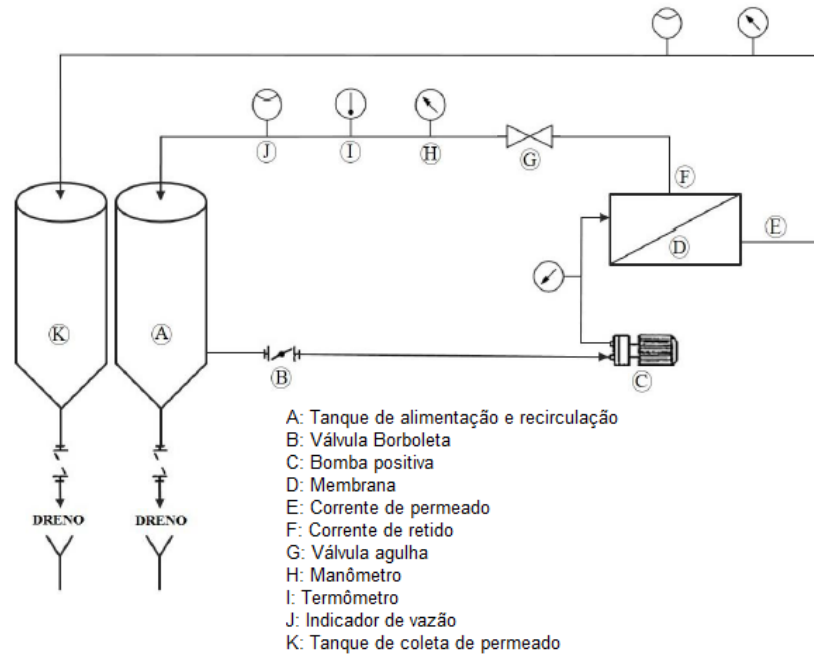
Posteriormente, o soro foi transportado sob refrigeração a 4°C em tarros de 50 L para a cidade de Passo Fundo. Uma amostra deste soro foi congelada -18°C para realização de determinações analíticas.

3.2 Concentrado proteico de soro de leite ovino

O soro de leite ovino desnatado (SLOD) e pasteurizado foi submetido ao processo de separação com membranas, utilizando membrana de UF de poliamida (KOCH Membrane Systems, modelo 3838-K131-VYV), com configuração em espiral, massa molecular de corte de 10 kDa, área de filtração de 1,8 m² e pressão de 2,0 bar. Foram concentrados, 108 L de soro de leite ovino. Os experimentos foram realizados no Laboratório de operações unitárias da Universidade de Passo Fundo (UPF). A Figura 1 mostra uma representação esquemática do processo de UF tangencial, utilizado nos experimentos.

A partir do processo descrito, foi obtido um concentrado (retido) e um permeado (o que passou pela membrana). Dos 108 L iniciais de soro, foram permeados 94,5 L, obtendo-se 13,5 L de concentrado da UF (fator de concentração igual a 8).

Figura 1 – Representação esquemática do sistema de membrana de UF de 10kDa



Fonte: Seguenka (2016).

O fator de concentração volumétrico (FCV) é definido como sendo a razão entre o volume inicial da solução e o volume do concentrado (ou retido) como descrito na Equação 1 (HERNÁNDEZ-LEDESMA, RAMOS E GOMEZ-RUIZ, 2011). O FCV é um importante parâmetro do processo, pois a concentração de um soluto varia tanto de acordo com a retenção do soluto pela membrana quanto na redução do volume.

$$FCV = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{(V_0 - V_P)} \quad (1)$$

Onde, FCV é o fator volumétrico, V_R é o volume de retido (concentrado) (L), V_0 é o volume inicial da solução (L), e V_P é o volume do permeado (L).

O fluxo volumétrico do permeado da UF (UFP) foi verificado no início do processo e a cada 15 L de permeado, até completar o volume referente ao fator de concentração, conforme Equação 2 (HABERT, BORGES, e NOBREGA 2006).

$$J_p = \frac{V}{A \cdot t} \quad (2)$$

Onde, J_p é o fluxo do permeado em ($L/m^2 h$); A é a área permeável da membrana (m^2); V é o volume de permeado (L) e t o tempo de permeação (h).

Ao final do processo de UF do SLOD, 1,0 L de concentrado e 1,0 L de permeado foram congelados a $-80^\circ C$ por 24 h em freezer vertical (Consul) acondicionado em frascos de vidro de capacidade de 200mL. Em seguida, as amostras foram desidratadas em liofilizador (Módulo 4K Freeze Dryer Edwards) a temperatura de $-40^\circ C$ por 48h, para posterior caracterização. Os 12,5 L de concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO) resultantes do processo de UF foram utilizados para o processo de DF.

3.3 Concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado

O CPSLO obtido (12,5 L) foi submetido ao processo de DF, nas mesmas condições operacionais da UF. No entanto foi adicionado ao CPSLO, 100 L de água com alto grau de pureza (água potável que passou por processo de osmose inversa) e deixado permear 100 L. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, ou seja, realizados 3 ciclos de lavagem utilizando 100 L de água em cada lavagem, assegurando que ao final do processo de DF permanecessem retidos os 12,5 L iniciais do processo, originando o concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD).

Os fluxos dos permeados de cada DF, denominados de primeiro permeado da DF (DFP_1), segundo permeado da DF (DFP_2) e terceiro permeado da DF (DFP_3), foram verificados no início do processo e a cada 15 L de permeado até completar o volume referente ao fator de concentração, conforme Equação 2.

Amostras do concentrado e permeado dos 3 ciclos de DF foram congelados a $-18^\circ C$ em refrigerador (Consul) para determinações analíticas. O CPSLOD foi desidratado em liofilizador (Edwards), onde processo de desidratação seguiu os mesmos passos descritos no item 3.2.

3.4 Atividade Enzimática

A protease comercial (Corolase H-pH) foi cedida gentilmente pela Ab Enzymes e avaliada quanto a atividade enzimática. De acordo com os dados do fornecedor, a Corolase H-pH é uma protease alcalina de origem fúngica, produzida por uma estirpe geneticamente modificada do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. A enzima, é considerada pelo fabricante como eficiente na hidrólise de proteínas, seja de origem vegetal ou animal. Por esta razão, e em se tratando de uma protease nova no mercado que carece de trabalhos envolvendo sua aplicação, a mesma foi escolhida para investigação frente a hidrólise do CPSLOD (Solução 10% p/v).

A atividade enzimática da enzima foi determinada através da metodologia de Dias et al. (2008). Inicialmente adicionou-se 1,5 mL de solução de caseína 0,5% (m/v) (Synth), em tampão Tris-HCl (tris (hidroximetil) aminometano cloridrato) 0,05 mol/L – pH 9,0 (Synth), 0,750 mL de enzima ou extrato enzimático e 0,150 mL de ativadores Cisteína- Cys (10^{-2} M) (Sygma Aldrich) e ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA (4×10^{-3} M) (Ohemis) em tubos de centrífuga de 50 mL, seguido de agitação por 5 s. Para o padrão (branco), utilizou-se 3 mL de caseína, 0,300 mL de ativadores (Cys (10^{-2} M) e EDTA (4×10^{-3} M) e 1,5 mL de água destilada ao invés do extrato enzimático. Os tubos foram imersos em banho-maria (Quimis, modelo 0214M2) a 37°C durante 30 min. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) nas amostras e 3 mL de TCA no padrão. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 rpm durante 25 min a 4°C em centrífuga (Instruments-Biosystems. Modelo MPW-351R-MPW). Os sobrenadantes foram adicionados em uma cubeta de quartzo e a leitura efetuada em espectrofotômetro (Pró-Análise modelo UV1600) a 275nm.

Para determinar o equivalente em tirosina liberado foi realizada uma curva padrão de tirosina de acordo com Food Chemicals Codex (1996) e obtida a equação da reta. A unidade foi expressa em $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$ e foi definida como a quantidade de Tirosina-Tyr (μg) produzida por minuto por 1mL de extrato enzimático.

A atividade das enzimas foi calculada de acordo com a Equação 3 (DIAS et al., 2008).

$$U/mL = \frac{\mu g \text{ Tyr} \times V_f}{V_a \times t} \quad (3)$$

Onde, $\mu g \text{ Tyr}$ é o valor obtido a partir da absorbância da amostra (obtido da curva padrão de tirosina); V_f é o volume total (em mL) de reagentes utilizados na análise. Neste caso = 3,75 mL (os ativadores não contam); V_a é o volume da amostra (em mL) de extrato enzimático. Neste caso = 0,750 mL; t é o tempo (em min) de incubação. (Neste caso = 30 min).

Segundo o fabricante (Ab Enzymes), a protease Corolase H-pH, atua em faixa de pH de 6 a 10 e temperatura de até 60°C. De acordo com De Wit (1998), existe uma relação entre pH e temperatura, em valores de pH superiores a 8,6, ocorre alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas, ocorrendo uma desnaturação irreversível, enquanto que em pH neutro e temperaturas de até 70°C a desnaturação é reversível e em pH até 8,6 em temperaturas superiores a 80°C a estrutura nativa das proteínas não é alterada.

Para verificar os efeitos do pH e da temperatura em relação a atividade enzimática foi efetuado um planejamento fatorial completo 2^2 . Para cada ensaio, 50 mL de solução tampão Tris-HCl e 1% de enzima) foram baseados nas informações do fabricante e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Níveis e variáveis utilizados no planejamento 2^2 para avaliação da atividade enzimática.

Variáveis		Níveis		
Independentes	Códigos	-1	0*	+1
Ph	X ₁	6	7	8
Temperatura (°C)	X ₂	40	50	60

*triplicata de ponto central.

A quantidade de enzima utilizada neste trabalho foi baseada na dosagem máxima indicada pelo fabricante que é de 1% baseado no conteúdo proteico (quantidade de proteína presente na solução 10% (p/v) do CPSLOD). Os

erlenmeyers foram acondicionados em plataforma de agitação orbital (*shaker-ethik technology* - Ultitec, modelo 430 RD), agitados a 100 rpm e em diferentes tempos de reação (1,2,3,4,5 e 6 h). Para avaliar a atividade enzimática, em cada tempo eram retiradas alíquotas de 0,750 mL de extrato enzimático.

3.5 Hidrólise Enzimática

Com base nas melhores condições de atividade enzimática, obtida com planejamento fatorial 2² utilizando a enzima corolase H-pH, foram realizados ensaios de hidrólise em CPSLOD a 10% (p/v), testando concentrações de 1 e 10% de enzima, baseadas no conteúdo proteico, a fim de verificar se o aumento no teor enzimático promoveria um incremento significativo no grau de hidrólise em 3 h (tempo intermediário, das 6 h usadas nas hidrolises posteriores). O melhor resultado, foi avaliado quanto a reação de hidrólise ao longo do tempo (1, 2, 3,4 ,5 e 6 h).

A hidrólise foi realizada em erlenmeyers de 250mL, contendo 50mL da solução hidratada, acondicionados em incubadora com plataforma de agitação orbital (*shaker- ethik technology* - Ultitec, modelo 430 RD), aquecidos a 60°C e agitados a 100 rpm. Quando as amostras atingiram a temperatura de 60°C adicionou-se a enzima, permanecendo nestas condições, ao longo dos tempos investigados e então submetidas a inativação enzimática.

3.6 Teste de Inativação Enzimática

As amostras submetidas à hidrólise foram inativadas enzimaticamente em cada tempo (3h e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) em banho maria (Quimis, modelo 0214M2). A inativação enzimática foi realizada de acordo com a metodologia de Dias et al. (2008). Alíquotas de 2 mL solução 10% (p/v) de CPSLOD e dos hidrolisados em diferentes tempos foram avaliados antes e após inativação pelo calor a 75°C/15 s), eram adicionadas em tubos de centrifuga com capacidade para 50 mL, juntamente com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Merck) a 10%. Para o teste padrão substituiu-se a amostra por água destilada. As amostras e o padrão foram centrifugados a 10.000 rpm por 25 min, a 4°C e os sobrenadantes submetidos a leitura em espectrofotômetro (Pró-Análise, UV 1600) em 125 nm. O resultado do

teste positivo para inativação foi dado pela manutenção dos valores de absorbância obtidos entre as amostras antes e após inativação pelo calor, demonstrando assim, que não houve liberação de tirosina pela enzima.

3.7 Grau de Hidrólise

A reação de hidrólise foi acompanhada em diferentes tempos (3h no primeiro teste e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h no segundo teste), seguindo especificações do item 3.6.

O grau de hidrólise foi avaliado de acordo com a metodologia da AOAC (2005). Inicialmente, adicionou-se 5 mL da amostra de hidrolisado do CPSLOD (solução 10% p/v), em erlenmeyer de 125 mL, com o pH ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec) 0,2 mol/L ou com o ácido clorídrico (HCl) (Synth) 0,2 mol/L e 5 mL da solução de formol-fenolftaleína (formol - Cinética e fenolftaleína - Nuclear), também, ajustada para pH 7,0 com as mesmas soluções (NaOH e HCl ambos 0,2 mol/L) e 3 gotas de fenolftaleína 1%. O conteúdo do erlenmeyer foi então titulado com NaOH 0,2 mol/L até viragem da cor para rosa claro e o volume (V_1) registrado. O mesmo volume gasto na primeira titulação foi então acrescentado como excesso, tornando a coloração rosa intenso e o volume (V_2) registrado. A solução foi novamente titulada, porém com HCl 0,2 mol/L até desaparecimento da cor rosa (retrotitulação) e o volume (V_3) registrado. A quantidade de NaOH gasto na titulação (X) e a quantidade de HCl gasto na retrotitulação, foram obtidas por meio das Equações 4 e 5:

$$X = \frac{(Fc \text{ NaOH})(V_1 + V_2)}{1000\text{mL}} \quad (4)$$

$$Y = \frac{(Fc \text{ HCl})(V_3)}{1000\text{mL}} \quad (5)$$

Onde, V_1 é o volume gasto (mL) na primeira titulação com NaOH 0,2 mol/L; V_2 é o mesmo volume gasto na primeira titulação; V_3 é o volume gasto (mL) na retro-titulação com HCl 0,2 mol/L; Fc é o fator de concentração da

solução de titulação; X é o nº de mols de NaOH gasto na titulação; Y é o nº de mols de HCl gasto na retrotitulação.

Para avaliar o Nitrogênio α -aminado (K) levou-se em consideração a quantidade de NaOH gasto na titulação (X) menos a quantidade de HCl gasto na retrotitulação (Y). O Grau de hidrólise foi então obtido pela Equação 6.

$$GH\% = \frac{K}{N_{total}} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde, GH é o grau de hidrólise; N total é a porcentagem de Nitrogênio determinada pelo método de Kjeldahl (proteína).

Os hidrolisados, avaliados ao longo do tempo (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h), também, foram avaliados em relação a atividade antioxidante, antimicrobiana e frações proteicas. Os hidrolisados que apresentaram o melhor conjunto de propriedades biológicas foram caracterizados quimicamente por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, descrito no item 3.11.

3.8 Caracterização do Soro de Leite Ovino e das Frações da UF e da UF/DF.

No Quadro 1 é apresentado um resumo das análises físico-químicas das amostras obtidas neste trabalho.

a) pH

Para determinação de pH foi utilizado um pHmetro (Digimed, DM-22), realizando-se leituras diretamente na amostra a uma temperatura de 25°C, segundo a metodologia descrita pela AOAC (2005).

b) Umidade

A umidade das amostras foi obtida gravimetricamente em estufa de recirculação (Fanem – 320 - SE) a 105°C por aproximadamente 4 h e/ou até peso constante, segundo metodologia descrita pela AOAC (2005). Sólidos totais

foram determinados em estufa a 105°C (AOAC, 2005). Análise de cinzas em Mufla a 500°C (AOAC, 2005).

Quadro 1 – Análises realizadas nas amostras de soro de leite ovino (SLO), nas amostras de soro de leite ovino desnatado (SLOD), concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO), concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD), permeado da UF (UFP), permeado da primeira DF (PD₁), permeado da segunda DF (PD₂), permeado da terceira DF (PD₃), hidrolisado do concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD-H).

Amostras	Análises
SLO	Gordura
SLOD	pH, condutividade, umidade, sólidos totais, proteína, lactose, gordura, cinzas, cor, e eletroforese.
CPSLO	Análise de condutividade, umidade, proteína, lactose, gordura, cinzas, eletroforese, pH, sólidos totais e cor.
CPSLOD	Análise de condutividade, umidade, proteína, lactose, gordura, cinzas, eletroforese, pH, sólidos totais e cor.
UFP	Umidade, proteína, lactose, cinzas e eletroforese.
DFP ₁	Umidade, proteína, lactose, cinzas e eletroforese.
DFP ₂	Umidade, proteína, lactose, cinzas e eletroforese.
DFP ₃	Umidade, proteína, lactose, cinzas e eletroforese.
CPSLOD-H	Proteína, lactose e eletroforese.

c) Proteína Total

A proteína total, foi determinada através do método de Kjeldahl, através do conteúdo de nitrogênio segundo a metodologia descrita pela AOAC (2005). O fator de multiplicação utilizado foi o de produtos lácteos que é de 6,38.

d) Gordura

A gordura foi determinada através de extração com mistura de solvente à frio (IDF/FIL, 1986).

e) Lactose

A determinação de lactose foi realizada segundo metodologia descrita por Miller (1959) pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria com espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, modelo 8453E) a 570nm e para quantificação utilizou-se uma curva padrão de lactose cuja concentração variou em intervalo de 0,5 a 5,0 g/L.

f) Índice de Cor

A cor foi determinada através do colorímetro portátil (Minolta-CR400), com fonte de luz D65, na escala de L^* , $-a^*$, $+b^*$ do sistema CIELab, a 25°C. A calibração do aparelho foi realizada seguindo as instruções do fabricante. As coordenadas de cromaticidade a^* e b^* indicam as direções das cores, desta forma, $a^* > 0$ é a direção do vermelho, $a^* < 0$ é a direção do verde; $b^* > 0$ é a direção do amarelo e $b^* < 0$ é a direção do azul (MINOLTA, 1994). As amostras serão dispostas em placa de Petry com 9,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura, onde foram adicionadas 10mL dos tratamentos. A determinação ocorreu em 3 pontos diferentes da amostra.

g) Condutividade

As medidas de condutividade elétrica foram realizadas em condutivímetro (TEC – 4MP, TECNAL), realizando-se leituras diretamente nas amostras e calibrado conforme o fabricante.

h) Frações Proteicas

A eletroforese foi realizada seguindo a metodologia de Laemmli (1970), utilizando gel dodecilsulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e padrão de massa molar 10 a 200 kDa e 5 a 250 kDa (PageRuler, 4-20% Tris-glycine SDS-PAGE). As amostras foram submetidas em corrente constante de 300 mA e tensão de 250 V por aproximadamente 60 min. As bandas de

proteínas presentes foram visualizadas utilizando solução corante azul brilhante (Blue R-250).

3.9 Determinação de propriedades funcionais das frações concentradas da UF e UF/DF

As amostras do CPSLO e CPSLOD desidratadas em liofilizador (Módulo 4K Freeze Dryer Edwards) a temperatura de - 40°C por 48h, foram avaliadas quanto a solubilidade proteica e a estabilidade das emulsões, na Universidade UDeLaR localizada na cidade de Montevideu no Uruguai.

3.9.1 Solubilidade proteica

A solubilidade proteica foi determinada de acordo com o método de Morr et al. (1985). As amostras liofilizadas foram hidratadas em solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 em temperatura ambiente, na concentração de 1mg/mL e agitadas por 60 min em béquer com agitador magnético. Em seguida as amostras foram centrifugadas em centrífuga Sorvall ST8R Thermo Scientific a 10.000g, durante 10 min a 4°C. O teor de proteína solúvel do sobrenadante foi determinado utilizando-se o método do ácido bicinconínico (BCA), considerado equivalente em sensibilidade ao método de Lowry, porém quanto ao preparo de reagentes apresenta maior facilidade. Este método baseia-se na reação de redução do cobre - Cu (II) → Cu (I), em meio alcalino, promovida pelas proteínas. O Cu (I), por sua vez, forma um complexo com o BCA, o qual absorve fortemente na região de 562 nm. Os valores obtidos foram substituídos na Equação 7. E as determinações realizadas em triplicata.

$$PS = \frac{C_s \times 50}{W \times \frac{S}{100}} \times 100 \quad (7)$$

Onde: PS é o teor de proteína solúvel presente na amostra (%), C_s é concentração proteica no sobrenadante (mg/mL), W é o peso da amostra (mg), e S é a concentração de proteína na amostra (%).

3.9.2 Índice de atividade emulsificante

a) Preparo das emulsões

Inicialmente, preparou-se emulsão de óleo em água na proporção de 25:75 (v/v), utilizando-se 15mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,0) e 5 mL de óleo comercial (95% de óleo de girassol e 5% de óleo de milho) em uma concentração de proteína de 1,0 mg/mL. As emulsões foram preparadas a temperatura ambiente com um homogeneizador (Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, GmbH e Co, Staufen, Alemanha). A velocidade do rotor (S25N-10G, GmbH e Co. Staufen, Alemanha) foi de 20.000 rpm e o tempo de homogeneização de 1 min.

b) Determinação da estabilidade das emulsões

A estabilidade global das emulsões foi avaliada usando um analisador óptico vertical (Turbiscan Classic MA2000, Formulaction, Toulouse, France). As emulsões recentemente preparadas foram colocadas em células cilíndrica de vidro (70 mm) para registrar os perfis de transmitância (T%) e a retrodispersão (RD %) em função da altura da célula. O estudo da cinética de desnaturação e desestabilização das emulsões foi realizado mediante a medida da retrodispersão a cada min durante um período de 60 min e uma medida única, transcorrido 24 h.

Os dados de RD a uma altura de 10 mm foram ajustados a uma equação (Equação 8) de segunda ordem bifásica descrita por Panizzolo (2005).

$$RD(t) = \frac{RD_1}{(RD_1 K_1 t + 1)} + \frac{RD_2}{(RD_2 K_2 t + 1)} \quad (8)$$

Onde: K_1 e K_2 são as constantes de velocidade; RD_1 e RD_2 as porcentagens de retrodispersão a uma altura de 10 mm do tubo a um tempo t para cada término; K_1 e RD_1 correspondem as partículas maiores que são as que desnaturam mais rápido; e K_2 e RD_2 correspondem as partículas menores, as quais desnaturam mais lentamente segundo descrito pela Lei de Stokes.

3.10 Determinação das propriedades biológicas dos hidrolisados

As propriedades biológicas (atividade antioxidante e atividade antimicrobiana) dos hidrolisados do CPSLOD (solução 10% p/v) pela enzima corolase H-pH foram determinadas nos tempos de 1,2,3,4,5 e 6 h, empregando-se as melhores condições de atividade enzimática, obtida com planejamento fatorial 2² concentração enzimática com o maior grau de hidrólise.

3.10.1 Atividade antioxidante

O potencial antioxidante foi avaliado a partir da medida de atividade antioxidante *in vitro* pela captura de radicais livres com o teste de difenilpicrilhidrazina (DPPH). Neste teste permite-se verificar a atuação desses hidrolisados como doadores de átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação de DPPH na forma reduzida de DPPH – H que é medido espectrofotometricamente. A metodologia é fundamentada na medida da extinção da absorção do radical DPPH em 515 nm (MIRANDA e FRAGA, 2006).

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por método espectrofotométrico. A técnica consistiu na incubação por 30 min, de 500 µL de uma solução aquosa de DPPH 0,1 mM (Sigma-Aldrich) com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0% dos hidrolisados. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 9. Utilizou-se como branco (padrão) o etanol (Synth -pureza de 95%) e controle a solução de DPPH.

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\} \quad (9)$$

A determinação foi realizada em espectrofotômetro (Pró-Análise modelo UV1600) em comprimento de onda de 515 nm, com o objetivo de avaliar a absorbância das diferentes concentrações das amostras. Após a obtenção da equação da reta, calculou-se a concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão (CARBONARI, 2005).

3.10.2 Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, empregou-se as bactérias Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* e a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes*, em virtude de provocarem infecções em humanos sendo ambas de origem alimentar (CHIU, SU e CHU, 2004; CRUZ, MARTINEZ e DESTRO, 2008).

As bactérias (American Type Culture Collection - ATCC) foram previamente crescidas em meio Lúria Bentani - LB (Acumedia), por 24 h a 37°C em estufa (Menocin-TecnoFrio), chamado de pré-inóculo. Os procedimentos foram realizados em cabines de segurança biológica sob condições assépticas. O teste foi realizado em triplicata com volume total de 200 µL em cada poço das microplacas (Figura 2a), com preparo de controle (200 µL de meio LB). Os Hidrolisados foram testados variando-se a concentração em relação ao meio LB: 30 e 70% (60 µL de hidrolisado e 140µL de meio LB), 25 e 75% (50µL de hidrolisado e 150µL de meio LB), 20 e 80% (40µL de hidrolisado e 160µL de meio LB). Para todas as concentrações foram adicionados 10 µL do pré-inóculo. Após o preenchimento das microplacas foi realizada a primeira leitura em leitora Elisa (Thermo Plate, EL 800) (Figura 2). Posteriormente as mesmas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h onde foi realizada nova leitura em comprimento de onda de 490 nm (SILVA, 2013).

Figura 2 - Microplaca de microtitulação (ELISA) com 96 poços (a); Leitora Elisa *Thermo Plate* (b).



(a)



(b)

A capacidade inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de hidrolisado necessária para inibir completamente o crescimento da bactéria.

3.11 Determinação de Peptídeos Bioativos

As condições em que os hidrolisados, apresentaram a melhores atividades; antioxidante e antimicrobiana, foram avaliadas quanto aos peptídeos bioativos, determinando-se as suas massa carga (m/z) em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Autoflex III smartbeam).

O princípio do método consistiu na adição das amostras em uma placa com matriz polimérica onde ocorreu a conversão das biomoléculas para a fase gasosa sem fragmentação (FERREIRA, 2009). As amostras foram irradiadas com laser promovendo a ionização das moléculas que foram então aceleradas através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo e individualmente analisados por analisador (TOF- tempo de voo) (CUNHA, CASTRO e FONTES, 2006). Conforme o tempo de chegada os íons geraram diversos picos os quais foram expressos através da relação massa-carga (m/z) indicando quantidades variáveis de cada substância analisada (FERREIRA, 2009).

As amostras foram analisados em espectrofotômetro de massa do tipo MALDI-TOF (placa MALDI - *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization* e analisador TOF (*Time of flight*) no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com a pretensão de determinar as massas moleculares dos componentes presentes e assim identificar os possíveis peptídeos bioativos. Inicialmente, as amostras foram diluídas em água grau de pureza MS 100x, em seguidas dispostas em placa MALDI em volume de 1 μ L de cada e misturadas a 3 μ L de matriz ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico em acetonitrila 70%, 30% água e ácido trifluoroacético 0,2%. O método de operação seguiu o modo de aquisição refletor positivo (RP_pepmix), faixa de massas de 300 a 5.000 m/z . Soma de 3900 espectros acumulados de 50 em 50 por amostra. Intensidade de laser 40%. Método de operação com modo de aquisição linear positivo (LP_Clinprot), faixa de massas de 400 a 18.000 m/z . Soma de 4000 espectros acumulados de 100 em 100 amostra. Intensidade do laser entre 30 e 40%.

Em função do espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF não estar acoplado ao detector massa (MS/MS), as respostas foram geradas em massa-carga (m/z). (Não foi possível sequenciar os peptídeos, pois o sistema não possuía banco de dados). Assumindo, que as amostras tenham sido ionizadas, conforme a calibração do equipamento em $1H^+$ (massa do hidrogênio), os valores obtidos no MALDI-TOF em m/z foram equiparados aos valores em Da.

Para avaliação da massa molecular média do peptídeo utilizou-se o cálculo empírico proposto por Perea et al. (1993), onde o comprimento médio da cadeia foi calculado de acordo com as Equações 10 e 11:

$$CMC = \frac{100}{GH} \quad (10)$$

Onde, o CMC é o Comprimento médio da cadeia; 100 é o comprimento médio da cadeia de um aminoácido e o GH é o percentual de grau de hidrólise (ADLER-NISSEN 1986).

$$MM = (120 \text{ Da}) (CMC) \quad (11)$$

Onde, o MM é a massa molar média; 120 Da é a massa molecular média de um aminoácido (MYERS et al., 1974).

3.12 Tratamento dos dados

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata e os resultados foram tratados estatisticamente mediante metodologia de planejamento de experimentos, pela análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de *Students* e *Tukey*, e correlação de *Pearson* com auxílio do software *Statistica* versão 5.0, ao nível de significância de 95 % de confiança.

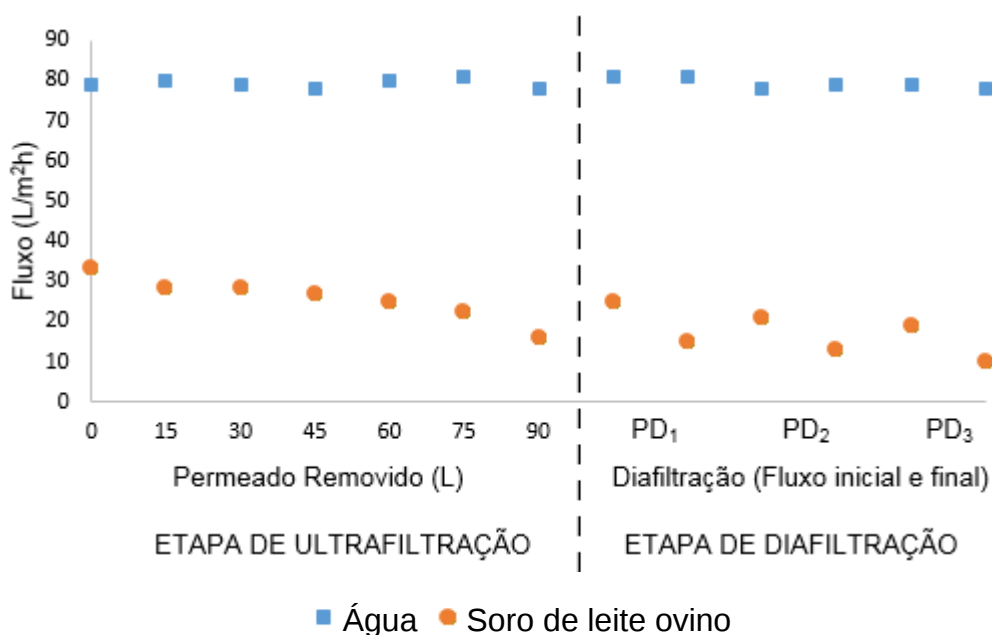
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo serão apresentados os resultados e discussões dos processos de UF, DF, hidrólise enzimática, propriedades funcionais e biológicas e peptídeos bioativos.

4.1 Fluxo de permeado da membrana de UF

Os fluxos de permeado do soro de leite ovino desnatado da UF/DF, bem como da água são apresentados na Figura 3. Na etapa de concentração o fluxo de soro iniciou em 33 L/m²h e foi reduzindo ao longo do tempo chegando ao final do processo em 16 L/m²h. Uma das razões para esta redução deve-se a retirada do permeado e a concentração de sólidos. Para Lautenschlager Filho e Pereira (2009), o decréscimo ocorre em virtude do processo de colmatção da membrana. Estes fluxos são menores do que os da água, o que já era esperado, pois diferente do soro, a água não apresenta sólidos que possam bloquear a permeação.

Figura 3- Fluxos de permeado para membrana de 10kDa a 2 bar para água e soro de leite ovino, para as etapas de UF e DF.



Fonte: O autor (2018).

A água com alto grau de pureza apresentou fluxo médio de 79 L/m²h (Figura 3). Valores similares (76 L/m²h) foram obtidos por Seguenka (2016) utilizando a mesma membrana e pressão de 2 bar.

O fluxo do permeado da UF (UFP) foi similar aos obtidos por Seguenka (2016) utilizando soro de leite bovino (SLB) com emprego da mesma membrana de UF e 2 bar. Esta diminuição do fluxo se deve aos fenômenos de polarização (formação da camada gel) e *fouling*. Para Leidens (2013) o *fouling* em lácteos é causado especialmente pelas proteínas e gordura.

O fluxo inicial do primeiro permeado da DF (DFP₁) foi mais elevado (25 L/m²h) quando comparado ao fluxo final do UFP. Isto pode ter ocorrido em virtude da adição de água na DF que diluiu o concentrado, facilitando a passagem pela membrana. O fluxo final do terceiro permeado da DF (DFP₃) foi em torno 10 L/m²h, ocorrendo uma redução de 60% em relação ao fluxo inicial da DF. Esta diminuição pode ocorrer devido à deposição de sais de cálcio sobre as membranas, além da interação destes sais com as proteínas, fazendo diminuir o fluxo (RICE et al., 2009), devido ao *fouling* da membrana. De uma forma geral, todos os constituintes do soro podem influenciar no *fouling* da membrana, que também reduzem o fluxo do permeado.

4.2 Características físico-químicas do soro de leite ovino desnatado e físico-químicas e funcionais das frações da UF e da UF/DF

Na Tabela 5 são apresentados os resultados das características do soro de leite ovino desnatado e das frações da UF e da UF/DF. Os valores de umidade do SLOD, CPSLO e CPSLD foram de 93,31% ± 0,02, 90,25% ± 0,02 e 95,06% ± 0,04 e para UFP, DFP₁, DFP₂, DFP₃ foram de 95,74% ± 0,04, 98,82% ± 0,03, 99,89% ± 0,02 e 99,99% ± 0,02, respectivamente. Esses valores de umidade podem variar em função da adição de água em processos de fabricação de queijos que antecede a dessoragem (SERPA, 2005). Além disso, podem oscilar, dependendo da raça e estágio de lactação dos animais (TRONCO, 2010).

O SLOD apresentou pH 6,14, que é caracterizado como sendo um soro de leite doce ou soro doce por apresentar pH superior a 6,0 (BRASIL, 2013).

Tabela 5 – Valores médios de pH, condutividade elétrica, sólidos totais, proteína, lactose, gordura, cinzas, Cor L* a* b* para soro de leite ovino desnatado (SLOD), concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO) e concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD).

Parâmetros	SLOD	CPSLO	CPSLOD
pH	6,14 ^a ± 0,24	6,17 ^a ± 0,21	6,43 ^a ± 0,17
Condutividade (μS/cm)	2083 ^b ± 4,77	2357 ^a ± 5,77	196,27 ^c ± 0,71
Sólidos Totais (%)	6,69 ^b ± 0,02	9,75 ^a ± 0,02	4,94 ^c ± 0,04
Proteína ¹ (%)	19,27 ^c ± 0,01	40,94 ^b ± 0,08	84,30 ^a ± 0,05
Lactose ¹ (%)	73,12 ^a ± 0,10	53,96 ^b ± 2,01	6,32 ^c ± 0,02
Gordura ¹ (%)	0,93 ^c ± 0,05	1,81 ^b ± 0,07	4,76 ^a ± 0,06
Cinzas ¹ (%)	7,24 ^a ± 0,07	4,56 ^b ± 0,07	0,48 ^c ± 0,11
Cor L*	38,85 ^b ± 0,04	37,84 ^c ± 0,14	42,12 ^a ± 0,19
Cor a*	-1,69 ^b ± 0,07	-2,91 ^c ± 0,06	-1,59 ^a ± 0,02
Cor b*	6,08 ^a ± 0,08	4,76 ^b ± 0,01	1,89 ^c ± 0,01
Cromaticidade C*	6,31 ^a ± 0,09	5,58 ^b ± 0,02	2,47 ^c ± 0,01

Média ± desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% (Teste de Tukey).

¹ Valores em base seca.

O soro doce segundo Martins (2000) origina-se a partir da coagulação enzimática do leite pela adição do coalho ou renina, constituída de uma mistura de enzimas (quimosina e pepsina), sendo os queijos; Cheddar, Mozzarella, Parmesão e Provolone obtidos por este processo. O autor ainda salienta que o soro ácido é obtido a partir da incorporação de ácidos orgânicos ao leite, promovendo a coagulação, sendo o queijo Petit-Suisse o mais popular dentre os queijos produzidos. Portanto, o pH do SLOD (Tabela 5) utilizado neste estudo, em virtude de originar-se da produção de queijo colonial, o qual utiliza enzimas na sua produção, atendeu ao pH proposto para o mecanismo de processamento empregado. Os valores de pH não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos soros (SLOD, CPSLO e CPSLOD), indicando que não ocorreu mudança durante o processo de UF e DF.

A condutividade do CPSLOD em relação ao CPSLO reduziu em aproximadamente 92 %. Indicando, que ocorreu uma redução de íons, os quais são relacionados aos minerais. Além da permeabilidade de minerais pela membrana, devido ao tamanho (10kDa), a diluição da amostra pelo acréscimo

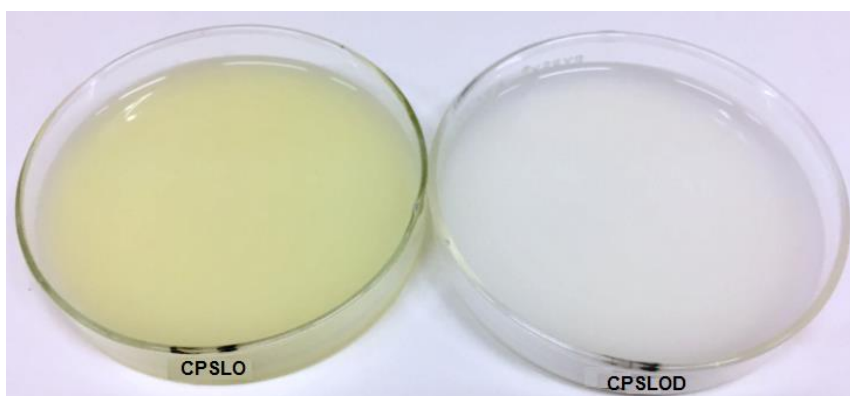
de água no processo de DF, também contribui para estas diminuições. Do mesmo modo que no presente estudo, Leidens (2013) e Oliveira (2017) também observou uma redução na condutividade elétrica ao longo do processo de UF e DF.

Nos sólidos totais verifica-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras. Um incremento nas concentrações de sólidos foi verificado durante o processo de UF, sendo o maior valor apresentado pelo CPSLO. Assim como para Leidens (2013) na CPSLO, uma redução foi constatada durante o processo de DF (Tabela 5), que pode estar associada ao emprego de sucessivas lavagens promovendo remoção de moléculas de lactose e minerais (HUFFMAN; FERREIRA, 2011). O SLO líquido antes do desnate apresentou percentual de gordura de 0,31% e após o desnate de 0,09%. De acordo com Miller, Jarvis, Mcbean (2000), o percentual de gordura em SLO encontra-se na faixa de 0,35 a 0,4%. Este percentual pode variar de acordo com a raça e a alimentação dos animais que produzem o leite, bem como do tipo do queijo, o qual gera o soro. Como no processo de UF ocorre facilmente o entupimento dos poros e formação de *fouling* que diminuem o fluxo de permeado devido aos constituintes do soro, principalmente a gordura, se faz necessário um desnate prévio do soro como apresentado por Cruz et al. (2017), que pode aumentar a eficiência do processo de UF (GIRALDO-ZUÑIDA et al., 2004). De acordo com a Tabela 5, ocorreu um aumento dos teores de gordura nos processos de UF e DF, diferindo estatisticamente entre si ($p > 0,05$), comparado com o SLOD.

Os valores de L^* referem-se a luminosidade da amostra e variam de zero (0- preto) a cem (100-branco) na escala. O CPSLOD diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais, apresentando o menor valor de sólidos totais de 4,94% e a maior luminosidade de 42,12 enquanto que o CPSLO apresentou o maior valor de sólidos totais de 9,75% e a menor luminosidade de 37,84. De acordo com García-Pérez et al. (2005) reduções nos valores de L^* podem ser atribuídas ao aumento da concentração de moléculas e conseqüentemente reduções na água livre do produto. Valores intermediários para SLO, foram encontrados tanto para sólidos totais quanto para o parâmetro L^* . Caldeira et al. (2010) avaliaram cinco formulações à base de leite de búfala, soro de queijo tipo frescal e iogurte e verificaram que as formulações com maiores percentuais de sólidos totais apresentaram menor reflexão de luz, ou seja, menor valor de L^* .

A cor b^* nas amostras de SLOD, CPSLO e CPSLOD (Tabela 5) apresentaram valores positivos, o que as caracterizam como amareladas, pois, a cor b^* varia do azul (negativo) ao amarelo (positivo). Comparada as outras amostras, o CPSLOD apresentou o menor valor ($p<0,05$), indicando a cor menos amarelada, como pode ser observada na Figura 4. Comportamento similar para a coordenada de cromaticidade b^* , foi encontrada por Azevedo et al. (2014), no desenvolvimento de filmes de concentrados proteicos de soro de leite (CPS) com 80 % de proteína para o uso em alimentos. Segundo os autores a presença de lactose e cinzas pode contribuir para esta coloração. Isso poderia justificar a diminuição ($p<0,05$) da intensidade da cor amarela do CPSLOD, já que, em comparação aos demais tratamentos; SLOD; CPSLO apresentou os menores valores ($p<0,05$) de lactose e cinzas. Enquanto que o SLOD apresentou a maior intensidade ($p<0,05$) de coloração amarela, e também, os maiores valores de lactose e cinzas.

Figura 4- Imagem do CPSLO e do CPSLOD.



Fonte: O autor (2018).

A coordenada cromática a^* varia de verde (negativo) ou vermelho (positivo). O CPSLO apresentou-se com a maior ($p<0,05$) tonalidade verde em relação as demais amostras, e também o maior ($p<0,05$) teor de sólidos totais. Enquanto que o CPSLOD apresentou o menor teor de sólidos totais e cor menos esverdeada que as demais amostras (SLOD e CPSLO).

Os valores do índice croma (C), diminuíram durante o processo de UF/DF, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre as amostras (Tabela 5). Segundo Granato e Masson (2010), quanto mais elevados os valores de croma, maior a intensidade da coloração. Deste modo, percebeu-se que a associação

processo de DF ao processo de UF, promoveu a redução da intensidade da coloração.

O teor de proteína total do CPSLO e do CPSLOD aumentou em relação ao SLOD, diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$), onde o CPSLOD apresentou maior valor (Tabela 5). Em termos percentuais de proteína, o CPSLO foi duas vezes superior ao SLOD, assim, como o CPSLOD também foi duas vezes maior que o CPSLO. A concentração do SLOD pelo processo de UF associado ao processo de DF proporcionou incremento de 337% proteína no produto final (CPSLOD).

Este incremento proteico está relacionado com tamanho de poro da membrana (10 kDa), onde a faixa de tamanho das proteínas do soro de leite em geral variam entre 14 kDa (α -La) e 1000kDa (Ig), onde as mesmas ficam retidas na membrana (WAL, 2001; WAL 2004). O mesmo, acontece também com a gordura (PEPPIN e ELLIOT, 2001).

O teor de lactose diminuiu em 26 e 91% no CPSLO e CPSLOD, em relação ao SLOD, apresentando diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$). Isto indica que no processo de DF ocorre a passagem da lactose pela membrana devido às lavagens sucessivas. A lactose é uma importante fonte de energia, contudo, a diminuição ou eliminação desse hidrato de carbono no produto é interessante para indivíduos que apresentam limitações ou intolerância a esse constituinte.

A membrana de 10 kDa empregada neste estudo, por apresentar massa molecular de corte superior ao peso molecular da lactose Brans et al., (2004), não deveria reter a lactose, mas como relatado por Arguello et al. (2002), a formação na camada gel na superfície da membrana e o *fouling* podem interferir na seletividade da membrana. O autor ainda menciona que o *fouling* pode ser provocado pela presença de frações proteicas dentro dos poros da membrana. Schneider e Tsutyia (2001) acrescentam que o *fouling* pode aumentar a polarização por concentração na medida em que retém solutos na superfície.

Na literatura vários trabalhos, também, mostram a efetividade da DF na concentração de soro de leite bovino. De La Fuente et al. (2002) durante a concentração de SLB por processo de UF/DF verificou que os componentes não proteicos de baixo peso molecular permearam pela membrana. Seguenka (2016), em membrana de 10kDa obteve 89,95% de proteína em base seca e

percentual de lactose não identificado pela metodologia utilizada. Para a autora, a associação dos processos de UF e DF permitiu uma maior concentração de proteínas e redução nos níveis de lactose, já que, os valores iniciais do SLB em base seca foram de 15,53% de proteína e 76,7% de lactose. Pacheco et al. (2005) obtiveram valores de proteína e lactose de 82,72% e 6,64%, também em membrana de 10kDa após a DF de SLB.

Borges et al. (2001), ao associar o processo de DF ao processo de UF com membrana de 10 kDa obtiveram concentrados bovinos com valores de proteína acima de 80% e lactose abaixo de 15%. Pagno et al. (2009) em membrana de polietersulfona em módulo espiral, com massa molecular de corte de 10 kDa, pressão de 2 bar e FC= 6, obteve valores para os três tratamentos (utilizando processo de concentração de SLB associado ao processo de diafiltração) de 56%, 71% e 80% de proteína e 31%, 18% e 10% de lactose. O volume inicial de soro foi de 30 L, no primeiro tratamento com quatro ciclos de DF (2 x 5L e 2 x 2,5L) totalizando-se 15 L (volume total de água utilizado), no segundo tratamento utilizaram o mesmo número de ciclos de DF porém variaram a adição dos volume (2 x10 L e 2 x 5 L) somando-se 30 L (volume total de água utilizado) e no terceiro tratamento aumentaram dois ciclos comparados aos demais tratamentos, totalizando-se seis ciclos de DF (6 x 5 L) equivalendo-se ao volume do segundo tratamento de 30L (volume total de água utilizado). Em virtude da membrana ser seletiva para proteína e não para lactose, a proporção de concentração para as duas composições variaram de maneira a apresentarem a razão (proteína/lactose) variável durante todo o processo de concentração.

O Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais (BRASIL,1998) que dispõe sobre os alimentos produzidos para portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos como a lactose por exemplo, e ou portadores de erros relacionados ao metabolismo de carboidratos passará a vigorar com alterações para a lactose, em 24 meses após a publicação da Resolução - RDC nº 135, de 8 de fevereiro de 2017, ou seja, as empresas terão o prazo para adequação até o início de 2019, onde passarão a existir duas classificações para alimentos e dietas com restrição de lactose; alimentos isentos de lactose ($\leq$ a 100 mg/ 100 g ou mL) e alimentos com baixo teor de lactose (>100 mg e ≤ 1 g /100 g ou mL), alimentos que contenham lactose

deverão informar no rótulo quando a concentração for acima de 0,1% (BRASIL, 2017). A norma aprovada no dia 31 de janeiro de 2017 pela Anvisa é decorrente da Lei 13.305 de 2016, que tornou obrigatória a informação da presença de lactose nos rótulos de alimentos. Embora os valores de lactose tenham sido reduzidos no concentrado proteico de soro de leite diafiltrado, o mesmo contendo 6,32% de lactose, se utilizado na forma pura, seria enquadrado pela RDC nº 135, de 8 de fevereiro de 2017 como alimento que contém lactose. Porém os hidrolisados deste concentrado em solução 10% (p/v) investigados neste estudo, apresentaram 0,6% de lactose enquadrando-se como alimento com baixo teor de lactose incluindo-se na categoria de alimentos para fins especiais. A presença de lactose em alimentos também está associada a problemas de cristalização na produção de lácteos, já que, apresenta solubilidade reduzida em relação a outros açúcares (dez vezes menor que a solubilidade da sacarose), acarretando aos produtos aspecto de arenosidade (ORDÓÑEZ, 2005).

Os valores de proteína encontrados no presente estudo não foram superiores a 90%, por isso não podem ser classificados como um isolado proteico de soro (SMITHERS, 2015). Como o valor de lactose foi de 6%, proteína de 84% e gordura de 5%, o soro DF pode ser considerado um concentrado proteico (CPS-80), pois se encontra na faixa estabelecida para proteína (80-82%), lactose (4-8%) e gordura (4-8%) de acordo com a classificação (Antunes, 2003). Portanto o CPSLOD pode ser classificado como um concentrado proteico, podendo ser utilizado como fonte proteica em produtos de interesse.

Com o intuito de verificar o que ainda restava nos permeados da ultrafiltração (UFP) e das 3 diafiltrações (DFP₁, DFP₂ e DFP₃), os mesmos foram caracterizados em relação a proteína, lactose e minerais, podendo demonstrar aplicações para outros trabalhos futuros, sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Com estes resultados verifica-se que os teores de proteína, lactose e cinzas do UFP foram maiores e diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos permeados das diafiltração. O permeado da UFP poderia ser utilizado em outros estudos, visando aplicações de interesse. Já os permeados da diafiltração devido às sucessivas lavagens, todos os teores foram reduzidos e inclusive não sendo mais detectados, provavelmente devido à grande incorporação de água.

Tabela 6 – Resultados dos teores de proteína, lactose e cinzas para UFP, DFP₁, DFP₂ e DFP₃

Parâmetros	UFP	DFP ₁	DFP ₂	DFP ₃
Proteína ¹ (%)	5,81 ^a ± 0,01	1,01 ^b ± 0,22	0,5 ^c ± 0,15	ND
Lactose (%)	3,88 ^a ± 0,10	0,86 ^b ± 0,01	0,01 ^c ± 0,005	ND
Cinzas ¹ (%)	8,04 ^a ± 0,10	1,36 ^b ± 0,05	ND	ND

Média ± desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de significância de p<0,05% pelo Teste Tukey. ¹Valores em base seca; ND – Não determinado.

Em processos de UF, compostos de menor peso molecular, como a lactose (BRANS et al., 2004) e os minerais são capazes de ultrapassar a membrana (DALLAS et al., 2014), o que também foi observado no presente estudo, devido aos valores encontrados nos permeados.

Farro e Viotto (2003) encontraram valores de lactose entre 4,64 e 5,13% em permeados a partir da concentração de SLB em membrana de UF de 10kDa. Enquanto que Serpa (2005) em membrana de fibra oca com massa molar de corte de 10kDa, encontrou valor médio de lactose de 4,4% para permeado do CPSLB em diferentes pressões (0,5; 1,5; 1,0 bar). Valor inferior ao encontrado pelos autores foi obtido neste estudo para o UPF (Tabela 6). As diferenças nos valores podem estar associadas como destacado por Schneider e Tsutyia (2001) aos fenômenos de polarização de concentração, incrustações (*fouling*), fração da área de membrana ocupada por poros, espessura da membrana, que podem dificultar a permeação de moléculas de tamanhos inferiores ao tamanho de poro da membrana. A seletividade de membranas, como reforçado por Arguello et al. (2002) pode sofrer modificações em virtude do *fouling* e a formação da camada gel.

O valor proteico do UFP obtido neste estudo (Tabela 6) foi semelhante ao de Seguenka (2016) utilizando membrana de UF de 10 KDa e SLB, que correspondeu a 5,51%. Valor inferior de cinzas foi encontrado neste trabalho comparado ao valor de 9,08% obtido pela autora supracitada.

A Figura 5 mostra uma imagem dos permeados UFP, DFP₁, DFP₂ e DFP₃. Na medida em que os percentuais de proteína, lactose e cinzas (Tabela 6), foram diminuindo (p<0,05) nos permeados da diafiltração, comparados ao UFP observou-se a perda de coloração visual.

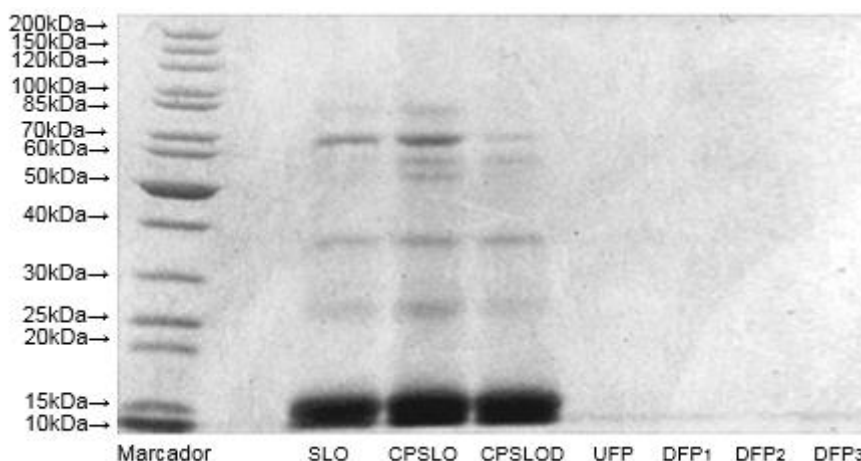
Figura 5- Imagem dos permeados UFP, DFP₁, DFP₂ e DFP₃.



Fonte: O autor (2018).

Em virtude do teor elevado de proteínas e reduzido de lactose do CPSLOD obtido nesta pesquisa, o mesmo apresenta potencial para investigações de hidrólise e geração de peptídeos bioativos. Para verificar as frações proteicas dos concentrados e permeados obtidos pela membrana de 10 kDa, realizou-se a análise da eletroforese com avaliações de bandas entre 10 kDa e 200 kDa, nas amostras de SLOD, CPSLO e nos permeados da UFP e dos DFP₁, DFP₂ e DFP₃ (Figura 6).

Figura 6- Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*) para as amostras de soro, concentrado e permeado da UF e concentrado e permeados da DF. Da esquerda para a direita: Coluna 1: marcador de massa molar; coluna 2: SLO; coluna 3: CPSLO; coluna 4: CPSLOD; coluna 5: UFP; coluna 6: DFP₁; coluna 7: DFP₂; coluna 8: DFP₃.



Fonte: O autor (2018).

As amostras de SLO, CPSLO e CPSLOD, apresentaram sinal forte para as proteínas β -Lg (18 kDa) e α -La (14 kDa), e menos intenso para a albumina do soro (69 kDa), que são característicos destas proteínas de acordo com Thompson, Boland e Singh (2009). De acordo com os as massas molares

propostas por Antunes (2003) para algumas proteínas do soro, outros sinais também, puderam ser observados entre as bandas de 25 a 85 kDa, que supostamente podem indicar a presença de imunoglobulinas de fração leve (25 kDa) e de fração pesadas (50 kDa) sinais fracos sugerem pequenas concentrações de lactoperoxidase (78 kDa) e lactoferrina (76 kDa). Hernández-Ledesma, Ramos e Gomez-Ruiz (2011), destacam a β -Lg, a α -La, como as principais proteínas do soro. Para eles, algumas particularidades em relação a concentração das proteínas podem ser observadas em relação as raças dos animais, segundo os autores o SLO apresenta teor médio proteico (9,6%) mais elevado que o SLB (7%).

Para Antunes (2003), embora existam diversas proteínas presentes no soro de leite, a β -Lg é a proteína responsável em maioria pelas propriedades funcionais dos concentrados proteicos de soro uma vez que encontra-se em maior concentração.

Abreu (2014) estudou soro de leite ovino e verificou a presença das β -Lg, α -La, lactoferrina e albumina do soro, sendo as três últimas encontradas em maiores proporções que o soro de leite bovino e caprino.

A presença de diferentes proteínas são de extrema importância em concentrados proteicos, pois como destacado por Antunes (2003), as mesmas apresentam funcionalidades distintas; as β -Lg apresentam propriedades gelatinizantes, enquanto que a α -La contribui para a formação de espuma. Além dessas propriedades, podem ser destacadas as propriedades bacteriostáticas apresentadas pela lactoferrina e lactoperoxidase. Quanto aos permeados da UFP, DFP₁, DFP₂ e DFP₃ verificou-se que os mesmos não expressaram sinal correspondente as proteínas β -Lg (18 kDa) e α -La (14 kDa), sendo que estas ficam retidas por apresentarem tamanho maior que o poro da membrana.

Tabela 7 – Valores de proteína total, proteína solúvel, K₁ e K₂ para o CPSLO e CPSLOD.

Amostra	Proteína Total (%) ¹	Proteína Solúvel (%) ¹	K ₁	K ₂
CPSLO	41 ^b	42 ^b	3,3.10 ^{-4a} ± 0,2	3,2 .10 ^{-3a} ± 0,3
CPSLOD	84 ^a	47 ^a	3,2.10 ^{-8b} ± 0,7	2,0.10 ^{-3b} ± 0,1

Média ± desvio padrão seguido de letras iguais/colunas indicam não haver diferença significativa á nível de 5% (t student); ¹Expressos em base seca.

Os resultados de proteína total, proteína solúvel, K_1 e K_2 para o CPSLO e CPSLOD são apresentados na Tabela 7. Os teores de proteína total e solúvel são maiores na DF, pois este processo proporciona maior concentração das proteínas devido as sucessivas lavagens promovidas.

As constantes K_1 e K_2 correspondem ao tamanho das gotas geradas, onde K_2 está relacionado às gotas grandes e K_1 às gotas pequenas. Como estas constantes representam a desestabilização da emulsão, quanto maiores as gotas, mais instável será a emulsão. Portanto, o CPSLOD apresentou emulsão mais estável. As gotas pequenas representadas por K_1 são as que formam creme mais lentamente com o tempo, assim o CPSLOD pode apresentar a formação de creme mais rápido, ou seja, mais estável.

Portanto, as emulsões preparadas com soro diafiltrado são mais estáveis em relação à desestabilização do creme. De acordo com McClements (2005), o tamanho das gotas produzidas durante a formação das emulsões dependem de dois processos: a geração de gotas de pequeno tamanho e a rápida estabilização destas gotas, o que evita a sua coalescência.

4.3 Atividade enzimática

A protease, corolase H-pH, utilizada nos ensaios de hidrólise do CPSLOD, na forma pura, apresentou atividade enzimática de 482 U/mL. Uma unidade (1U) refere-se à quantidade de Tirosina em μg produzida por min por 1 mL de extrato enzimático. A concentração de atividade enzimática (U/mL) em uma amostra, pode ser determinada, a partir da velocidade da reação catalisada pela enzima. A equação da reta gerada pela curva padrão de tirosina está apresentado no Apêndice A.

O valor de atividade da corolase H-pH, obteve-se acima da faixa de valores (34,71 - 63,19 U/mL) encontrados para as proteases; corolase PP, corolase TS, corolase LAP e corolase L10 estudadas por Silva et. al. (2009).

4.4 Grau de hidrólise (GH%) da protease corolase H-pH em diferentes concentrações

A enzima protease, corolase H-pH foi testada em duas concentrações (1% e 10%) com o objetivo de selecionar o percentual enzimático que apresenta-se o melhor grau de hidrólise em 3 h.

O CPSLOD hidratado em tampão Tris-HCl (pH 8,0) (solução aquosa a 10% (p/v)) hidrolisado pela protease H-pH em concentração enzimática de 10% apresentou grau de hidrólise médio de 15,32% ($\pm 0,07$). E com 1% de enzima apresentou 14,06% ($\pm 0,05$). Como o acréscimo de enzima em 10 vezes à solução de CPSLOD promoveu um aumento no grau de hidrólise de apenas 1,09 vezes, optou-se por conduzir a sequência dos experimentos com o menor percentual enzimático (1%), o que implica em menor custo de enzima.

4.5 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática da protease corolase H-pH

Na Tabela 8 é apresentada a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores reais e codificados) do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da protease corolase H-pH (1% baseada no conteúdo proteico do CPSLOD), em diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h).

As pequenas oscilações observadas (Tabela 8), podem sugerir estabilidade da enzima corolase H-pH com o tempo, frente às faixas de pH e temperatura estudadas. A atividade enzimática foi maior em hora, para todos os experimentos, com exceção do ponto central. Assim, tempos maiores de incubação não se justificam para aumentar a atividade enzimática.

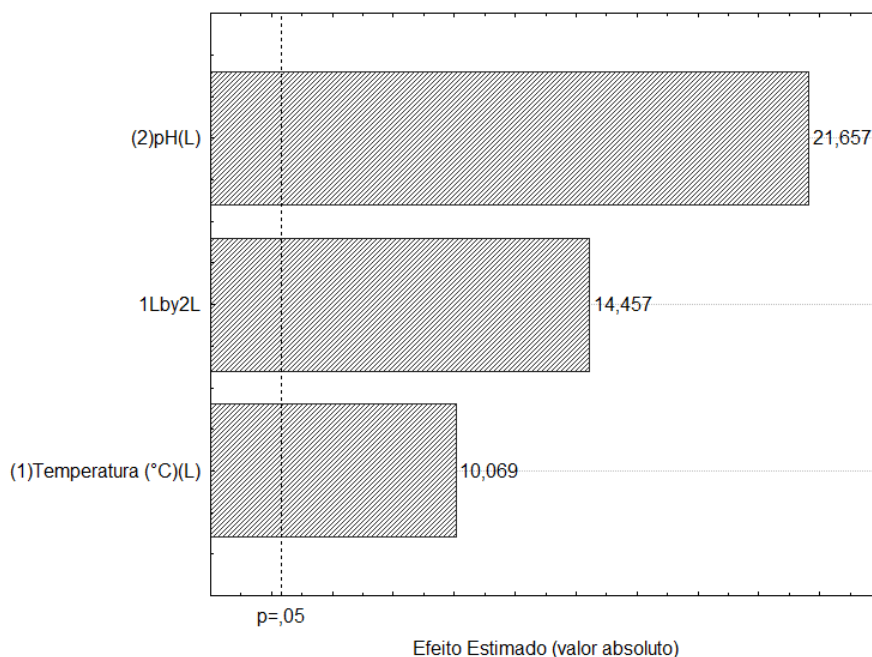
Desta forma, os resultados da atividade enzimática em 1h, foram selecionados para avaliação estatística, através do gráfico de Pareto (Figura 7), onde apresentam-se os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^2 . Observa-se que a atividade enzimática foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelo pH, temperatura e a interação entre as duas variáveis. O modelo não foi validado pela análise de variância (ANOVA), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,92 e o F calculado de 0,2 vezes menor que o valor tabelado.

Tabela 8- Matriz do planejamento fatorial 2² e resposta em termos de atividade enzimática (U/mL) em função do tempo de incubação.

Ensaio	Variáveis independentes*		Atividade Enzimática (U/mL)					
	X ₁	X ₂	Tempo de incubação (h)					
			1	2	3	4	5	6
1	40 (-1)	6 (-1)	26,79 ^a ± 0,10	26,28 ^b ± 0,20	25,25 ^d ± 0,00	25,64 ^c ± 0,10	24,48 ^e ± 0,10	23,33 ^f ± 0,10
2	60 (1)	6 (-1)	25,89 ^a ± 0,10	24,87 ^b ± 0,10	24,10 ^c ± 0,20	21,92 ^e ± 0,10	23,97 ^d ± 0,00	20,51 ^f ± 0,10
3	40 (-1)	8 (1)	26,92 ^a ± 0,10	26,28 ^b ± 0,20	25,77 ^c ± 0,12	25,64 ^c ± 0,10	25,51 ^d ± 0,11	23,71 ^e ± 0,10
4	60 (1)	8 (1)	29,10 ^a ± 0,10	26,92 ^b ± 0,11	26,66 ^b ± 0,20	27,05 ^b ± 0,20	26,02 ^c ± 0,21	25,38 ^d ± 0,10
5	50 (0)	7 (0)	25,51 ^a ± 0,13	25,64 ^a ± 0,12	25,87 ^a ± 0,12	24,74 ^b ± 0,11	24,61 ^b ± 0,10	24,61 ^b ± 0,12

*Média ± desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% (Teste de Tukey). X₁= Temperatura (°C); X₂= pH; Variáveis independentes fixas: corolase H-pH (1% baseada no conteúdo proteico do CPSLOD). O ensaio 5 é a média da triplicata do ponto central.

Figura 7 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a atividade enzimática da corolase H-pH em 1 h de incubação obtidos do planejamento fatorial 2².



Fonte: O autor (2018).

Em virtude de todas as variáveis avaliadas apresentarem efeito significativo positivo, foi escolhido o pH 8 e a temperatura de 60°C para a realização de experimentos de hidrólise com CPSLOD ao longo do tempo de 6 h.

4.6 Grau de hidrólise, atividades antimicrobianas e antioxidantes

A Tabela 9 apresenta o grau de hidrólise e atividades antimicrobianas do hidrolisado do CPSLOD (solução 10% p/v) pela protease corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em diferentes tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h). Observa-se um aumento gradativo no grau de hidrólise até 5 h de reação, apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tempos. Após 5 h de reação não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), sendo este o tempo de reação, o de maior grau de hidrólise.

Tabela 9 – Grau de hidrólise, atividade antimicrobiana da protease (corolase H-pH) em diferentes tempos.

Tempo (h)	Grau de Hidrólise (%)	Atividade Antimicrobiana	
		<i>Salmonella choleraesuis</i> (mg/mL)	<i>Listeria monocytogenes</i> (mg/mL)
1	12,07 ^e ± 0,06	5,0 ^e ± 0,01	12,5 ^c ± 0,04
2	13,03 ^d ± 0,06	5,0 ^e ± 0,01	15,0 ^b ± 0,07
3	14,06 ^c ± 0,05	7,5 ^d ± 0,01	15,0 ^b ± 0,06
4	15,18 ^b ± 0,07	10,0 ^c ± 0,04	20,0 ^a ± 0,08
5	15,55 ^a ± 0,01	12,5 ^b ± 0,06	20,0 ^a ± 0,07
6	15,55 ^a ± 0,01	15,0 ^a ± 0,06	20,0 ^a ± 0,10

*Média ± desvio padrão seguido de letras minúsculas iguais/colunas indicam não haver diferença estatística ao nível de 5% de significância (Teste de Tukey).

Os valores de grau de hidrólise permaneceram entre 12,07 e 15,55%, sendo similares aos encontrados para Adjonu et al. (2013) para isolados proteicos de soro de leite bovino (solução 5% w/v) utilizando-se pepsina, tripsina e quimotripsina em tempos de 12 e 24 h de hidrólise, oscilando entre 11 e 14%. Contudo no presente estudo o tempo de hidrólise (Tabela 9) foi menor utilizando

a enzima corolase H-pH. Enzimas submetidas a tempos maiores de hidrólise de 24 h apresentaram graus de hidrólise baixos como apresentado por Adjonu et al. (2013), devido à natureza globular das proteínas do soro de leite que podem limitar a atuação da enzima. O grau de hidrólise encontrado por Pacheco et al. (2005) em 6 h de reação, foi de aproximadamente 20% para os hidrolisados de pancreatinina, protamex e alcalase a partir de concentrado proteico de soro de leite bovino (solução 10% p/v) contendo após DF; 82,72 e 6,64% de proteína e lactose, respectivamente. Para Adjonu et al. (2013), o grau de hidrólise depende da enzima, já que cada uma possui sua especificidade. A enzima utilizada neste trabalho não foi investigada quanto a atuação enzima-peptídeo.

Silva et al. (2009), avaliando o grau de hidrólise de soluções aquosas (10% p/v) do concentrado proteico de soro de leite bovino (32,6% de proteína e 54,8% de lactose) por 5 h, constatou maior grau de hidrólise (30%) para a enzima pancreatinina (corolase PP), seguido da enzima *Aspergillus oryzae* (flavouzyme, de 27%) e relação enzima substrato 1:100.

Os hidrolisados em diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) apresentaram atividade antimicrobiana, frente a *Salmonella choleraesuis* e a *Listéria monocytogenes*. Todas as amostras analisadas controlaram mais efetivamente a *S. choleraesuis* (Tabela 9).

Dentre todos os tempos de hidrólise, a maior inibição para ambas as bactérias foi alcançada em 1 h, ou seja, concentrações menores de hidrolisado a partir do CPSLOD (solução 10% p/v) neste tempo foram necessários para inibir a *S. choleraesuis* (5 mg/mL) e a *L. monocytogenes* (12,5 mg/mL). O mesmo grau de inibição para a *S. choleraesuis* foi obtido no tempo de 2 h de hidrólise não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do tempo de 1h de reação, porém um menor grau de inibição foi constatado para a *L. monocytogenes* (15 mg/mL). Os tempos de hidrólise de 4, 5 e 6 h apresentaram a mesma inibição frente a *L. monocytogenes* de maneira a não apresentarem diferença estatística ($p < 0,05$), requerendo a presença de 20 mg/mL dos hidrolisados para esta ação. Para *S. choleraesuis*, quanto maior o tempo de hidrólise (3, 4 e 5 h) maior foi teor de hidrolisado necessário para sua inibição.

O tempo de 3 h de hidrólise a partir do caseinato de soro de leite ovino pela protease *Bacillus* sp.7 investigado por Corrêa et al. (2011) apresentou halos de inibição frente a bactéria *Bacillus cereus* de 9,3 mm, *Corynebacterium fimi* de

11,5 mm, *Aspergillus fumigatus* de 10,0 mm e *Penicillium expansum* de 9,0 mm. Corrêa et al. (2014), ao submeterem o hidrolisado no tempo de 3 h ao processo de UF em membrana de 10 kDa e avaliarem o concentrado e permeado quanto a atividade antimicrobiana, encontraram tamanhos de halos frente as bactérias *Bacillus cereus* e *Corynebacterium fimi* de 8,7 e 10,5 mm para o permeado e de 11,2 e 12,7 mm para o concentrado, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) avaliada no presente estudo é inversamente proporcional a medida dos halos e refere-se a concentração mais baixa (mg/mL) ou em percentual (%) do hidrolisado capaz de inibir a bactéria, para tanto, quanto menor for o CIM, maior será a área do halo e melhor será a potencialização do antibiótico.

Minervini et al. (2003) investigando hidrolisados de caseinato de sódio de leite humano pela protease parcialmente purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4 e obtiveram uma CIM de 50 µg/mL para a *Escherichia coli*. Além disso, inibição frente a *Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *Listeria innocua*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 100 µg/mL. As concentrações para todos os hidrolisados obtidos no presente estudo (Tabela 9) frente as bactérias testadas, foram superiores a faixa encontrada para os autores. Essa diferença pode estar associada ao mecanismo de ação dos péptidos gerados frente à inibição de bactérias (EPAND e VOGEL 1999). Para os autores, a atividade antimicrobiana está relacionada a peptídeos catiônicos, hidrofóbicos, anfipáticos, os quais possuem a capacidade de atuar sobre a membrana citoplasmática de bactérias.

Rizzello et al. (2005) estudaram queijo de leite ovino: Pecorino Romano, Canestrato Pugliese; bovino: Crescenza e Caciocavall e Caprino: caprino del Piemonte; bubalino: Mozzarella e avaliaram a inibição bacteriana frente ao *Lactobacillus Sakei* A15. Foram separadas em 36 frações peptídicas por *reversed-phase fast protein liquid chromatography* RP-FPLC, destas, as que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram avaliadas no MS/MS e corresponderam a faixa de CIM de 20 a 200 µg/mL (bactérias Gram-negativas e Gram-positivas). A faixa de inibição encontrada pelos autores foi consideravelmente menor a faixa encontrada no presente estudo (5 a 20 mg/mL). A maior capacidade de inibição encontrada pelos autores comparada ao presente estudo pode estar associada ao fracionamento desses

extratos por cromatografia (líquida de fase reversa). Para Lahov e Edelsten (1971) peptídeos liberados a partir da caseína pela enzima quimosina que se encontram na faixa aproximada de 5kDa são os responsáveis pela atividade antimicrobiana. Peptídeos antimicrobianos são constituídos em número que variam de 6 a 100 resíduos de aminoácidos (GIULIANI, PIRRI e NICOLETTO, 2007).

Dentre algumas proteínas presentes no CPSLOD, sugere-se pelo perfil eletroforético dos hidrolisados, que a β -Lg, α -La e a lactoferrina tenham sido hidrolisadas. As duas bactérias investigadas foram controladas desde a primeira hora de hidrólise, o que poderia ser sugestivo da liberação de peptídeos bioativos.

O peptídeo lactoferricina oriundo da digestão gástrica com pepsina da lactoferrina bovina foi identificado por Bellamy et al. (1992) como inibidor de proliferação e crescimento de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, incluindo resultados positivos para controle da bactéria *Listeria monocytogenes* também avaliada neste trabalho. Polipetídeos oriundos da digestão parcial da α -La por endopeptidases apresentam possível função antimicrobiana, principalmente frente a bactérias Gram-positivas (PELLEGRINI et al., 1999). Pellegrini et al. (1999) identificaram três fragmentos polipeptídicos com propriedades bactericidas a partir da α -La, obtidos por digestão pela pepsina, tripsina e quimotripsina, respectivamente. Quatro fragmentos peptídicos apresentando atividade bactericida frente a bactérias Gram-positivas foram encontrados por Pellegrini et al. (2001) ao investigar a digestão proteolítica pela tripsina da β -Lg bovina.

Na Tabela 10, diferentes tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) a partir do CPSLOD 10% (p/v) geraram valores de atividade antioxidante para a concentração máxima testada (3,0 mg/mL) de: 90,85%, 80,88%, 90,37%, 84,57%, 91,62% e 86,75%, respectivamente. Preci et al. (2011) encontraram valor superior de atividade antioxidante para extrato de erva-mate de 99,52% em concentração inferior (0,75mg/mL) a testada neste trabalho. Embora o hidrolisado tenha apresentado menor potencial antioxidante que o extrato de erva mate, a concentração do CPSLOD hidrolisado foi de apenas 10% (p/v) e não puro como o extrato testado pelos autores.

Os resultados de atividade antioxidante (AA%) dos hidrolisados a partir do CPSLOD (solução 10% p/v), em faixa de concentrações de hidrolisado (0,5 a 3,0 mg/mL) em diferentes tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h), estão apresentados na Tabela 10. Verificou-se que, a medida em que a concentração de cada hidrolisado aumentava, a atividade antioxidante, também aumentava em todos tempos de reação, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 10. Atividade antioxidante da protease (corolase H-pH) em diferentes concentrações de hidrolisado em relação aos tempos de hidrólise.

Concentração de hidrolisado (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)					
	Tempo de hidrólise (h)					
	1	2	3	4	5	6
0,5	18,29 ^{Fa}	16,14 ^{Fb}	13,33 ^{Fd}	11,46 ^{Fe}	8,96 ^{Ff}	13,59 ^{Fc}
	± 0,20	± 0,15	± 0,11	± 0,13	± 0,09	± 0,10
1,0	44,02 ^{Ea}	37,83 ^{Ec}	39,11 ^{Eb}	29,54 ^{Ee}	29,25 ^{Ee}	32,31 ^{Ed}
	± 0,26	± 0,24	± 0,20	± 0,20	± 0,15	± 0,20
1,5	61,28 ^{Da}	60,00 ^{Db}	61,64 ^{Da}	53,79 ^{Dc}	60,03 ^{Db}	59,91 ^{Db}
	± 0,33	± 0,35	± 0,30	± 0,29	± 0,31	± 0,26
2,0	74,44 ^{Cc}	69,32 ^{Ce}	78,48 ^{Ca}	72,22 ^{Cd}	77,51 ^{Cb}	75,13 ^{Cc}
	± 0,39	± 0,42	± 0,40	± 0,38	± 0,41	± 0,45
2,5	85,90 ^{Bb}	76,12 ^{Bd}	86,27 ^{Ba}	82,16 ^{Bc}	88,18 ^{Ba}	83,47 ^{Bb}
	± 0,26	± 0,48	± 0,50	± 0,52	± 0,55	± 0,56
3,0	90,85 ^{Aab}	80,88 ^{Ae}	90,37 ^{Ab}	84,57 ^{Ad}	91,62 ^{Aa}	86,75 ^{Ac}
	± 0,60	± 0,55	± 0,62	± 0,56	± 0,50	± 0,55

Média ± desvio padrão; letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras diferentes em uma mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% (Teste de Tukey).

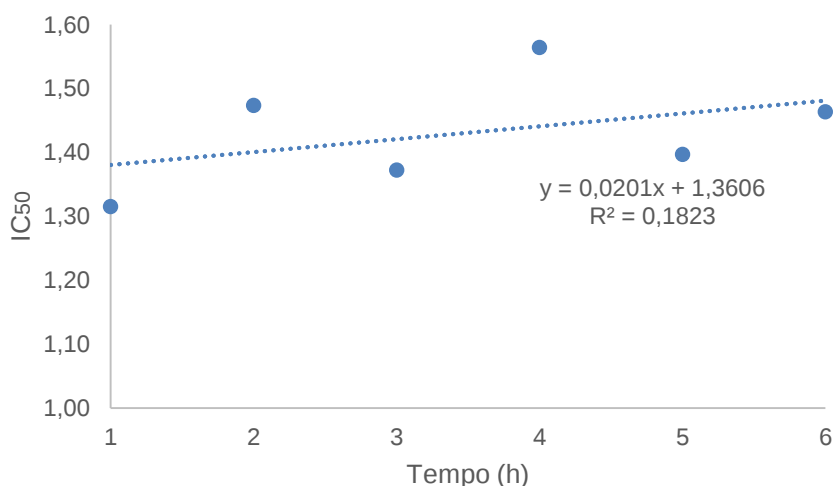
Embora, o coeficiente de *correlação de Pearson* tenha mostrado uma correlação positiva (0,52) entre a atividade antioxidante e o grau de hidrólise, ainda existe uma associação baixa entre ambos, em virtude do valor ser inferior a 0,7 (SAMPAIO, 2002). Assim, verifica-se que o aumentando do tempo de hidrólise, a enzima corolase H-pH não melhora a atividade antioxidante.

Corrêa et al. (2014), ao hidrolisar em soluções aquosas de soro de leite de ovelha (10g/L) por 6 h utilizando uma preparação de protease de *Bacillus* sp. P7 verificaram que quanto maior o tempo de hidrólise, maior a atividade antioxidante (ABTS - [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid]) dos hidrolisados identificando como péptido responsável derivado da β -Lg de sequência LAFNPTQLEGQCHV. Para Hernandez-Ledesma et al. (2005), a fração de 3kDa de hidrolisados de soluções de β -Lg e α -La (1mg/mL) foi a principal responsável pela atividade antioxidante encontrada de todo o hidrolisado.

Para a obtenção da Equação da reta do IC₅₀, foram construídos gráficos da atividade antioxidante em relação a concentração de hidrolisado para cada tempo de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) os quais são apresentados no Apêndice B.

A partir das Equações das retas de todos os tempos de hidrólise, calculou-se a concentração de hidrolisado necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) para cada tempo de hidrólise, conforme é mostrado na Figura 8. Os valores de IC₅₀ encontrados para os hidrolisados oscilaram entre 1,32 e 1,56 mg/mL.

Figura 8. Concentração de hidrolisado (1,2,3,4,5 e 6 h) necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀).



Fonte: O autor (2018).

Quanto menor o valor de IC_{50} , maior a atividade antioxidante da amostra, portanto, o tempo de 1 h de hidrólise foi o responsável pelo menor valor gerado para a capacidade antioxidante, seguida do tempo de 3 e 5 h. Lembrando que os valores de atividade referem-se aos hidrolisados a partir do CPSLOD (solução 10% p/v) com 8,43% de proteína. Esse incremento na atividade antioxidante pode estar associado a hidrólise enzimática, pois como destacado por Dryáková et al. (2010) a bioatividade de proteínas intactas tem apresentado melhoras após serem hidrolisadas por enzimas. As oscilações na atividade antioxidante podem associar-se a estrutura do peptídeo ou a presença de aminoácidos como destacado por Hernández-Ledesma et al. (2005).

Corrêa et al. (2011) constataram que a hidrólise proteica de a partir de caseinato ovino não apresentou efeito positivo perante a bioatividade investigada. Estes autores ao investigarem a atividade antioxidante por DPPH em tempos de hidrólise de 1, 2, 3 e 4 h utilizando a enzima *Bacillus* sp. P7, constataram maior atividade antioxidante (30,9%) em 1 h de hidrólise. Os autores obtiveram maiores percentuais de grau de hidrólise em maiores tempos de reação; (1% em 1h), (2,5% em 2h), (4% em 3 h) e (4,5% em 4 h). Porém, a maior atividade antioxidante se deu no início do processo.

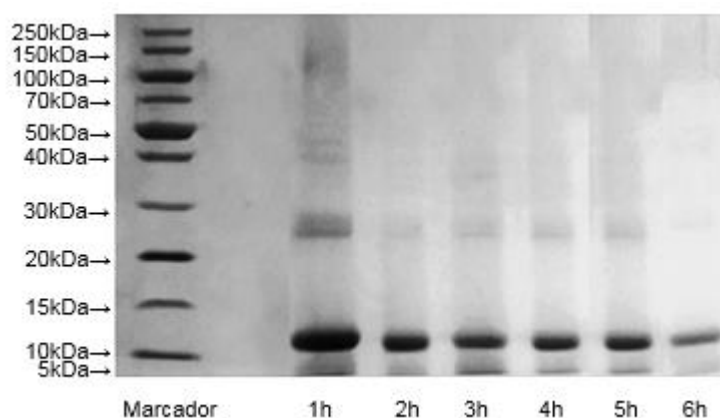
4.7 Frações proteicas dos hidrolisados

Os resultados das frações proteicas das amostras dos hidrolisados (1, 2, 3, 4, 5, e 6 h) a partir do CPSLOD (solução 10% m/v) diluído em tampão Tris-HCl (pH 8) com percentual de enzima H-pH de 1%, são apresentadas na Figura 9.

A menor banda detectada foi 5kDa, sinalizada para todos os hidrolisados, perdendo a intensidade em 6h de hidrólise. Uma banda de maior intensidade foi observada em 10kDa em todos os tempos de hidrólise. Sinais discretos foram observados entre a banda de 20kDa e 30kDa em 1 h de hidrólise, o que supostamente indicam a presença de imunoglobulinas de fração leve (25kDa). Esse sinal perdeu ainda mais a sua intensidade a partir de 2 h de hidrólise, o que poderia sugerir a hidrólise proteica, já que, o grau de hidrólise também aumentou em relação ao tempo de 1 h de 12,07% para 13,03%. A presença de

imunoglobulinas de fração leve (25k Da) também foram constatadas por Borges et al. (2001) em concentrado proteico de soro ácido.

Figura 9- Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*) para as amostras dos hidrolisados (1, 2, 3, 4, 5, e 6 horas) a partir da solução 10% (m/v) do CPSLO diluído em tampão Tris-Hcl (pH8,0) e percentual de enzima H-pH de 1%. Da esquerda para a direita: Coluna 1: marcador de massa molar; coluna 2: 1h de hidrólise; coluna 3: 2h de hidrólise; coluna 4: 3h de hidrólise; coluna 5: 4h de hidrólise; coluna 6: 5h de hidrólise; coluna 7: 6h de hidrólise.



Fonte: O autor (2018).

Antes da hidrólise, o CPSLOD apresentou sinal para albumina do soro (69kDa), e imunoglobulinas (25 a 50kDa), lactoferrina (76kDa) e lactoperoxidase (78kDa). Porém, após hidrólise as amostras apresentaram bandas em locais de menor massa molar, localizadas em 5kDa, 10kDa e entre 20kDa e 30kDa, indicativo de que as proteínas anteriormente presentes tenham sido hidrolisadas pela enzima em péptidos menores.

Ressalta-se, que em 1h de hidrólise tanto a α -La (14kDa) quanto a β -Lg (18kDa) deixaram se ser detectáveis no gel de eletroforese, sugerindo que ambas tenham sido completamente hidrolisadas pela enzima. Jeewanthikim et al. (2017) estudando diferentes tempos de hidrólise de concentrado proteico de soro de leite bovino (35% de proteína), solução 10% (w/v), com diferentes enzimas (pepsina, protease e alcalase), verificaram que a pepsina foi menos eficiente na degradação da β -Lg, levando o tempo de 5h para tal. De acordo com o perfil eletroforético encontrado pelos autores, as enzimas, apresentaram bandas proteicas em regiões distintas.

Sabadin, et al. (2012) utilizando a enzima alcalase a partir da β -Lg obtiveram hidrolisados com 12,6% de grau de hidrólise (GH), valor próximo ao encontrado neste trabalho em 1 h de hidrólise. Os autores encontraram bandas referentes a pequenas massas moleculares, correspondentes aos peptídeos de massa molecular inferior a 6,5 kDa. Concentrados proteicos de soro de leite bovino solução 10% (w/v), obtidos pelo método de ultrafiltração por Jeewanthikim et al. (2017) em membrana de 10kDa, antes de serem hidrolisados, apresentaram bandas na faixa de 50-98KDa, 16-22kDa e 6-16kDa, indicativos de BSA (69kDa), β -lg (18kDa) e α -La (14kDa) e após 2 h de hidrólise apresentaram perfil comum entre as enzimas utilizadas (protease, pepsina e alcalase) com sinais para as faixas de 16-22kDa e 6-16kDa. Os hidrolisados das enzimas quimotripsina e tripsina investigadas pelos autores, tenderam a apresentar sinais mais fracos para as regiões indicativas da presença de β -Lg e α -La comparadas ao concentrado sem adição de enzima.

4.8 Perfil peptídico dos hidrolisados

A partir dos valores de grau de hidrólise (Tabela 09) do CPSLOD (solução 10% p/v) pela protease, corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em diferentes tempos de hidrólise (1,2,3,4,5 e 6 h), foram calculados empiricamente a massa molecular média e o número de resíduos (Tabela 11).

Tabela 11: Massa molecular média e comprimento médio da cadeia peptídica das amostras em diferentes tempos de hidrólise.

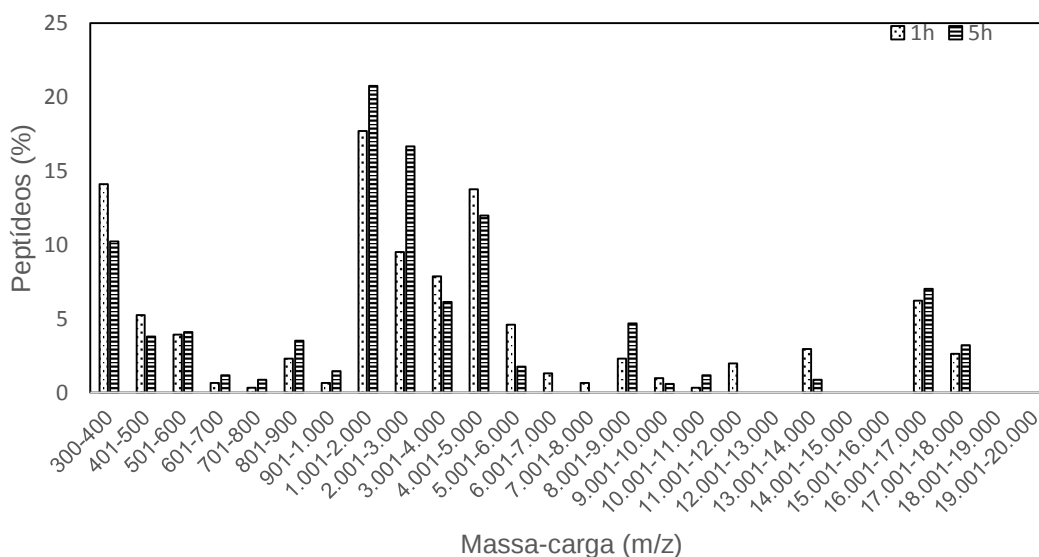
Tempos de hidrólise (h)	Massa média da molécula (Da)	Comprimento médio da cadeia (número de resíduos de aminoácidos)
1	994	8,29
2	921	7,67
3	853	7,11
4	791	6,59
5	772	6,43
6	772	6,43

Observa-se que a massa média da molécula e o comprimento médio da cadeia diminuíram com decorrer do tempo de hidrólise, estabilizando-se em 5 h com média de 6 resíduos de aminoácidos e massa molecular média de 772 Da.

Os resultados indicaram que a protease, corolase H-pH foi capaz de produzir um hidrolisado a partir da solução 10% (p/v) do CPSLOD em membrana de 10KDa com capacidade antioxidante e antimicrobiana em 1h de reação em concentração de 1% baseado no conteúdo proteico. Em tempo de hidrólise de 5h, a reação tornou-se constante, o que poderia indicar que a enzima, frente ao substrato, tenha atingido a sua capacidade hidrolítica máxima. Por estas razões, foram determinadas as massas-carga (m/z) dos tempos de hidrólise de 1h e 5h em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF. Assumindo que as amostras tenham sido ionizadas conforme a calibração do equipamento em $1H^+$ (massa do hidrogênio), os valores obtidos no MALDI-TOF em m/z foram equiparados aos valores em Da.

A Figura 10 apresenta os dados de percentagem de peptídeos no intervalo de 300-20.000 m/z para 1 e 5h de hidrólise.

Figura 10: Percentagem peptídeos no intervalo de 300-20.000 m/z para 1 e 5h de hidrólise.



Fonte: O autor (2018).

A partir dos espectros gerados por meio do MALDI-TOF, foram detectados 305 peptídeos com m/z distintas para a amostra de 1h de hidrólise. Em 5 h de

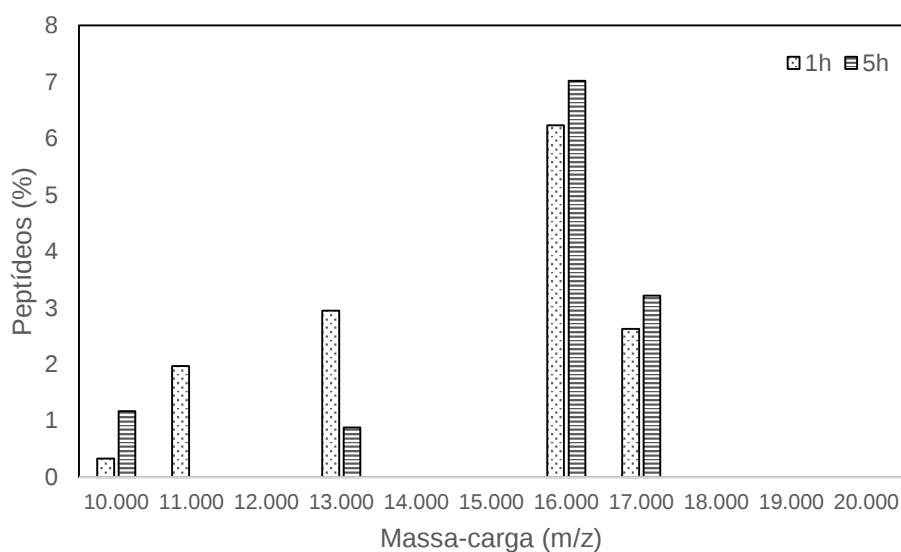
hidrólise observou-se um aumento de 12,13% no número de peptídeos comparado ao tempo de 1h, alcançando 342 peptídeos. Esse incremento em relação ao tempo de 1h, pode estar relacionado ao aumento no grau de hidrólise de 12,07% para 15,55% em 5h de reação. Intervalos <300m/z, não foram computados, pois a matriz utilizada na análise cristaliza junto com as amostras causando sobreposições no espectro. Para Silva et al. (2009), os hidrolisados a partir de concentrado proteico de soro de leite bovino (SOLUÇÃO 10% p/v), apresentaram (r) fraca (correlação de Pearson) entre grau de hidrólise e o perfil peptídico.

Foram constatados nos hidrolisados principalmente picos compreendidos entre 1.001-2.000 m/z (Figura 10), percentuais de 17,70% em 1h e percentuais de 20,76% em 5h. Outros picos em destaque corresponderam aos peptídeos entre 300-400 m/z (14,10%) e 4.001-5000 m/z (13,77%) em 1h de hidrólise e 2001-3000m/z (16,67%) e 4001-5000m/z (11,99%) em 5h de hidrólise. Corrêa et al. (2014), constataram que o permeado oriundo do hidrolisado (3 h) de caseinato de soro de leite ovino apresentou-se com maior inibição frente as duas bactérias estudadas, o que poderia sugerir que peptídeos com massas moleculares menores poderiam ter exercido maior efeito antimicrobiano. Os autores ainda submeteram o permeado a espectrometria de massa e identificaram o peptídeo majoritário como sendo correspondente ao fragmento de caseína α_{s1} com massa molecular de 1426 Da e íon de 714,3916 (2) (m/z). Welsh et al. (2017) associaram a atividade antioxidante de hidrolisados de soro de leite ovino utilizando-se uma protease de origem bacteriana e outra de origem fúngica aos péptidos com <15 aminoácidos.

O perfil peptídico do hidrolisado em 1h foi composto de 262 peptídeos <10.000 m/z. Enquanto, que o hidrolisado em 5h apresentou 300 peptídeos para esta mesma faixa. Esse incremento pode estar associado ao perfil eletroforético que após 1h de hidrólise, passou a apresentar sinais mais discretos entre a banda de 20 e 30 kDa, sugestivos de hidrólise de imunoglobulinas de fração leve (25kDa).

Observa-se que não foram constatados (Figura 11) a presença de peptídeos em 12.000, 14.000 e 15.000 m/z e ≥ 18.000 m/z para ambos os tempos de hidrólise avaliados, o que poderia sugerir hidrólise completa das soro proteínas e geração de um vasto perfil peptídico pela protease corolase H-pH.

Figura 11: Percentagem peptídeos >10.000m/z para 1 e 5h de hidrólise.



Fonte: O autor (2018).

Ao ser avaliado o perfil eletroforético constatou-se intensa atividade catalítica desde a primeira hora de reação, em virtude da degradação completa tanto da α -La (14kDa), quanto da β -Lg (18kDa). As duas bandas estavam presentes em gel de eletroforese em CPSLOD antes da Hidrólise (Figura 9). Pintado e Malcata (2000), ao avaliarem o perfil peptídico (Cromatografia por Exclusão de Tamanho) da α -La purificada hidrolisada em 2,5h pela tripsina verificaram que, após degradação da α -La surgiram essencialmente picos de 3.000-4.000 e 2.000-3.000 Da, e para β -Lg purificada picos de 4.000-6000 Da.

Em virtude dos hidrolisados deste trabalho serem compostos por uma mistura de proteínas, não foi permitido relacionar os peptídeos originados com as respectivas proteínas inicialmente presentes.

Pintado e Malcata (2000) em 2,5h de incubação da enzima tripsina em α -La purificada, detectaram vários peptídeos <500Da. Já em hidrólise da β -Lg purificada, os autores detectaram peptídeos <500Da somente em 24 h de hidrólise. Peptídeos <500Da foram encontrados no presente estudo já na 1ªh de hidrólise. Se considerar que um aminoácido apresenta massa molar média de 120Da (Myers et al., 1974) e que a ionização tenha ocorrido em $1H^+$ (massa do hidrogênio), os peptídeos compreendidos entre 300-400 m/z poderiam ser classificados como tripeptídeos e tetrapeptídeos.

Considerando que na faixa de 300 a 500m/z, em 1h de hidrólise, os peptídeos encontrados corresponderam a 23,28%. Enquanto, que em 5h de hidrólise o percentual foi de 18,13%, logo, em 5h de hidrólise houve uma redução de 22,12% nos tripeptídeos, tetrapeptídeos e pentapeptídeos.

Pintado e Malcata (2000), estudaram hidrolisados de soro de leite ovino, bovino e caprino pela enzima tripsina, e verificaram que a hidrólise gerou grande número de peptídeos de 500-4.000 Da. Em 24 h de incubação Silva et al. (2009) utilizando concentrado proteico de soro de leite bovino (32,65% de proteína e 54,8% de lactose) - solução 10% (p/v) e solução 7% (p/v) hidrolisado pelas enzimas, flavourzyme e corolase PP, respectivamente, ambas em concentração de E:S 1:100, obtiveram 16,14% de dipeptídeos, 9,12% tripeptídeos e ~20% de grandes peptídeos, os quais compreendem peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos.

Hernández-Ledesma et al. (2005) estudando a diferença na atividade antioxidante em distintos hidrolisados a partir da α -La e β -Lg (purificadas, a partir de soro de leite bovino) por pepsina, tripsina, quimotripsina, corolase PP e termolisina verificaram que esta atividade estava relacionada ao tamanho dos peptídeos gerados durante o processo e também a sequência de aminoácidos obtidos. Para os autores, os valores de atividade antioxidante dos hidrolisados foi atribuído principalmente ao permeado de 3.000 Da oriundo desses hidrolisados. A mesma relação não pode ser atribuída ao presente estudo, pois embora em 1h de hidrólise tenha sido constatada a maior atividade antioxidante (Tabela 10), os percentuais encontrados em 1h de hidrólise ≤ 3.000 m/z foram inferiores (54,43%) aos percentuais encontrados em 5h (62,57%) para esta mesma faixa. O mesmo foi relatado por Garcia-Mora et. al (2014) em que todos os hidrolisados de extrato de lentilha pelas enzimas; alcalase, protamex, corolase 7089 e savinase apresentaram teores de péptidos <3kDa sem relação com a atividade antioxidante.

Lahov et al. (1971) estudaram a atividade antimicrobiana em hidrolisados de caseína pela quimosina e verificaram que a mesma estava atribuída aos péptidos com massa molecular próxima a 5kDa. No presente estudo, o hidrolisado em 1h destacou-se em relação a atividade antimicrobiana (Tabela 9), onde para este foram encontrados maiores percentuais de péptidos (Figura 10) a faixa de 4.000m/z (13,77%) e 5.000m/z (4,59%) comparado ao tempo de 5h

de hidrólise que apresentou valores de 11,99% e 1,75%, respectivamente. De acordo com Giuliani, Pirri e Nicoletto (2007) os peptídeos antimicrobianos apresentam massa molecular bastante variável, e podem ser constituídos de 6 a 100 resíduos de aminoácidos. No presente estudo (Tabela 9 e Figura 10), peptídeos ≥ 12.000 m/z foram reduzidos em 49,04% em tempo de hidrólise de 5h, de 2,30% para 1,17%. Esta faixa calculada empiricamente a partir do relato de Giuliani, Pirri e Nicoletto (2007) sobre a faixa de aminoácidos com capacidade antimicrobiana, poderia ser atribuída a essa bioatividade encontrada em destaque em 1h de hidrólise.

Para Frenhani e Burini (1999), o metabolismo de proteínas ocorre inicialmente a formação de oligopeptídeos (2 a 6 resíduos de aminoácidos) além de aminoácidos livres e para que estes sejam absorvidos são novamente convertidos em di- e tripeptídeos, os aminoácidos livres, os quais são menos eficientes em níveis de absorção. Quanto a digestibilidade, quanto maiores os teores de di-tripeptídeos maior é a eficiência da assimilação na nutrição (SGARBIERI, 2004). Não foi possível relacionar a atividade antioxidante em 1h de hidrólise (Figura 8) aos peptídeos ≤ 3 kDa (Tabela 10), porém a atividade antimicrobiana (Tabela 9) pode ter relação com os peptídeos em faixa próxima de 5kDa, que foram superiores para este tempo de hidrólise avaliado.

Hernández-Ledesma et al. (2005) realizaram o fracionamento do permeado de 3 kDa a partir da β -Lg (purificada a partir de soro de leite bovino) pela corolase PP em cinco frações por cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase reversa (RP-HPLC) e constataram que as frações 1, 2 e 4 apresentaram maior atividade antioxidante, enquanto que as frações 3 e 5 foram menores. Os autores constataram a presença de 42 peptídeos no total, destes; 10 peptídeos corresponderam a 1ª fração, 15 peptídeos a 2ª fração, 8 peptídeos a 3ª fração, 4 peptídeos a 4ª fração e 5 peptídeos a 5ª fração. A atividade antioxidante constatada pelos autores não esteve relacionada ao número de peptídeos obtidos. A partir de testes com alguns fragmentos de peptídeos, os autores verificaram que a presença dos aminoácidos tripsina, tirosina, e metionina foram os responsáveis pela capacidade antioxidante dos peptídeos avaliados. A ligação peptídica neste caso pode ter minimizado a atividade antioxidante ou a própria presença de outros aminoácidos na composição podem ter atuado como antagonistas. Diferente ocorreu em outras sequências peptídicas

(metionina-histidina-isoleucina-arginina-leucina e valina-tirosina-glutamato-glutamato-leucina) testada, na qual constatou-se que a estrutura do peptídeo favoreceu atividade antioxidante comparado aos aminoácidos isolados.

De acordo com Minervini et al. (2003), podem ocorrer variações de concentrações de peptídeos em hidrolisados de diferentes tipos de leite. Isto pode estar associado a disparidade nas proporções de caseína, sequência de aminoácidos e conformação, que podem influenciar na atuação das enzimas durante a hidrólise e geração de peptídeos bioativos.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o tempo de 1 h de hidrólise com CPSLOD pela enzima corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico), em condições otimizadas de temperatura (60°C) e pH (8), são as melhores condições para a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante e antimicrobiana. Para Rizzello et al. (2005), a perda da bioatividade de peptídeos pode ocorrer em casos de grandes tempos de hidrólise, onde são degradados as sequências péptidas ativas das moléculas. O que poderia justificar o menor destaque frente às propriedades biológicas em 5 h de hidrólise do presente estudo.

Estudos nos mostram que as propriedades biológicas, estão associados não somente ao tamanho do péptido gerado mas também a sequência das frações aminoacídicas (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al. 2005). O perfil desses hidrolisados dependerão dos parâmetros empregados na hidrólise, das proteínas presentes, do tipo de enzima, proporção enzima-substrato e da concentração do hidrolisado.

Os dados obtidos com o MALDI-TOF geraram respostas apenas qualitativas dos picos que apareceram em intervalo de 300 - 20.000 m/z. Em virtude de não deter-se de padrão, não avaliou-se os péptidos quantitativamente (abundância relativa).

A realização do fracionamento por RP-HPLC poderia revelar a qual fração péptida a atividade antioxidante e antimicrobiana esteve associada. Em virtude do equipamento MALDI-TOF utilizado neste trabalho não ser acoplado ao MS/MS não foi possível realizar o sequenciamento e identificação de peptídeos potencialmente ativos.

5 CONCLUSÃO

O processo ultrafiltração (UF) associado ao processo de diafiltração (DF) em membrana de 10kDa na concentração de soro de leite ovino, aumentou em duas vezes o conteúdo de proteína total, atingindo o percentual de 84,3%. Favoreceu o incremento no percentual de proteína solúvel em 11,9% e reduziu os teores de lactose em 88,29%, também contribuiu para a melhora nas propriedades funcionais, conferindo uma emulsão mais estável. Em virtude de sua composição, o concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD) foi classificado como concentrado proteico de soro – CPS-80.

A atividade enzimática (482 U/mL), da protease corolase H-pH utilizada nos ensaios de hidrólise do soro de leite ovino UF/DF atingiu valor de superiores aos encontrados na literatura.

O pH e temperatura exerceram influência significativa ($p < 0,05$) sob a atividade enzimática da corolase H-pH, apresentando uma tendência de aumento da atividade para os maiores valores de pH (8,00) e temperatura (60°C).

O grau de hidrólise a partir do CPSLOD solução 10% (p/v) em condições otimizadas de temperatura (60°C) e pH (8,0) e concentração da corolase H-pH aumentada em 10 vezes o valor inicial (1% baseado no conteúdo proteico), contribuiu para o aumento no grau de hidrólise de apenas 1,09 vezes, demonstrando que o emprego da menor quantidade de enzima seria de maior coerência em âmbito industrial.

O grau de hidrólise promovido pela corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em CPSLOD solução 10% (p/v), 60°C e pH 8, permaneceu entre 12% e 15,55% durante as 6 h de reação e foi capaz de gerar um vasto perfil peptídico com propriedades biológicas. Em tempo de hidrólise de 5h, a reação tornou-se constante, o que poderia indicar que a enzima, frente ao substrato, tenha atingido a sua capacidade hidrolítica máxima.

A atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativa; *Salmonella Choleraesuis*, quanto para a bactéria Gram positiva; *Listéria monocytogenes* foi constatada em todos os tempos de hidrólise (1,2,3,4,5 e 6 h). Todas as amostras analisadas controlaram mais efetivamente a *S. Choleraesuis*. O tempo reacional

de 1 h apresentou menores valores de concentração inibitória mínima (CIM) frente às duas bactérias avaliadas.

A atividade antioxidante também foi detectada em todos os hidrolisados (1,2,3,4,5 e 6 h). Porém, o menor valor de concentração de hidrolisado necessária para capturar 50% (IC_{50}) foi em 1h de hidrólise.

O hidrolisado em 1h de reação em relação ao tempo de 5h apresentou o maior número de péptidos em intervalo de 300 a 500m/z (23,28%), também foram encontrados maiores percentuais de péptidos em faixa de 4.000m/z (13,77%) e 5.000m/z (4,59%) comparado ao tempo de 5h de hidrólise que apresentou valores de 11,99% e 1,75%, respectivamente. Além disto, péptidos ≥ 12.000 m/z foram reduzidos em 49,04% em tempo de hidrólise de 5h. Nas faixas mencionadas, o número de peptídeos foi superior em 1h de hidrólise e poderiam estar relacionados ao destaque frente as propriedades bioativas investigadas. As diferenças na distribuição do número de peptídeos em toda faixa investigada (300 – 20.000 m/z) em MALDI-TOF, foi alterada com o tempo de hidrólise, o que pode ter contribuído para degradação das sequências péptidas ativas das moléculas. A enzima corolase H-pH apresentou-se eficiente na degradação das soro proteínas β -Lg e α -La já na 1ª hora de reação.

O soro de leite ovino, apresentou-se com potencial para aplicação em produtos alimentícios de interesse, através do CPSLOD (solução 10% (p/v) em 60°C, pH 8,0) hidrolisado com a enzima corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico), demonstrando-se um co-produto com capacidade para geração de peptídeos bioativos. Sendo o tempo de reação de hidrólise de 1 h, o suficiente para apresentar atividade antioxidante e antimicrobiana frente a *Salmonella choleraesuis* e a *Listéria monocytogenes*.

Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar as propriedades funcionais (capacidade emulsificante, formação de espuma e solubilidade) do hidrolisado obtido em 1h de reação do CPSLOD.
- Realizar o fracionamento das proteínas de CPSLOD hidrolisadas em 1h pela protease corolase H-pH por RP-HPLC para verificar a qual fração a atividade antioxidante e antimicrobiana poderia estar associada.
- Determinar as sequências aminoacídicas responsáveis pela atividade antioxidante e antimicrobiana.
- Investigar o mecanismo de ação dos péptidos gerados frente à inibição de bactérias.
- Estudar a aplicação do CPSLOD hidrolisado em 1h em produto alimentício e verificar suas propriedades biológicas e funcionais.
- Investigar a associação da endopeptidase protease corolase H-pH, investigada neste estudo, a uma protease exopeptidase, na hidrólise do CPSLOD e geração de peptídeos.
- Concentrar e diafiltrar o soro de leite bovino nas mesmas condições do presente estudo e realizar hidrólise em 1 e 5h também nas mesmas condições e verificar suas propriedades biológicas e funcionais para comparar com o presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Mercado Internacional de Lácteos. **Irã, Quênia e Brasil: Três mercados a serem acompanhados no segmento do queijo**. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/>. Acesso em: 2018.

ABREU, M. C. **O potencial bioativo do soro de queijo após fermentação láctica comparação de diferentes tipos de soro**. Dissertação. Engenharia Alimentar- Qualidade e segurança. 2014.

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P. E.; AGBOOLA, S. **Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity**. Food Chemistry, v. 136, p. 1435-1443, 2013.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, London. Elsevier Applied Science Publishers, 427 p. 1986.

AHTESH, F.; STOJANOVSKA, L.; SHAH, N.; MISHRA, V.K. **Effect of Flavourzyme (®) on Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Formed in Skim Milk and Whey Protein Concentrate during Fermentation by Lactobacillus helveticus**. Journal of Food Science. Doi: 10.1111 / 1750-3841.13177. v. 81, n.1, p. 135-143, 2016.

ALMEIDA, C. C.; JUNIOR, C. A. C.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. **Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.9, n.16,1840 p., 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. Química Nova v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. **Methods for tenting antioxidant activity**. *Analyst* 127:183-198, 2002.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**, Editora Manole Ltda., São Paulo. 1 ed., p.135p, 2003. Disponível em: <https://books.google.com.br/books>. Acesso em: 2017.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. Maryland: AOAC, 18 ed., 2005.

AOKI, W.; UEDA, M. **Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics**. *Pharmaceuticals*, v. 6, n.8, p. 1055–1081, 2013.

ARGÜELLO, M.; ÁLVAREZ, E.; RIERA, F.; ÁLVAREZ, R. **Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes fouled by whey protein**. *Journal agricultores food chemical*, v. 50, p. 1951-1958, 2002.

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. **Investigation of ultra-and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose**. *Journal of Food Engineering*, London, v.67, n. 3, p. 325-332, 2005.

AZEVEDO, V. M.; COSTA, A. L. R.; FUKUSHIMA, K. L.; BORGES, S.V. **Propriedades de barreira, mecânicas e ópticas de filmes de concentrado proteico de soro de leite**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.69, n.4, p.237-247, jul./ago. 2014.

BAKER E.N., BAKER H.M. **Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin**. *Cellular Molecular Life Science*. v. 62. p. 2531–2539, 2005.

BAKER, H.M.; ANDERSON, B.F.; KIDD, R.D.; SHEWRY, S.C.; BAKER, E.N. **Lactoferrin threedimensional structure: a framework for interpreting function**. Amsterdam. Elsevier Science, 2000.

BARBANO, D. **Milk protein products - what are they and what role do they play in lactose reduced (low "carb") foods**. Food Science. 2009. Disponível em: http://ldairy.comell.edu/CPDMPIPages/Publications/Pubs/Milk_Protein_Products.pdf. Acesso em: 2015.

BELLAMY, W.; TAKASE, H.; YAMAUCHI, K.; WAKABAYASHI, H.; KAWASE K.; TOMITA, M. **Identification of the bactericidal domain of lactoferrin**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), v. 1121, n. 1-2, p. 130-136, 1992.

BENKERROUM, N. **Antimicrobial Peptides Generated from Milk Proteins: A Survey and Prospects for Application in the Food Industry: A Review**. International Journal of Dairy Technology, v. 63, p. 320-338, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00584.x>. Acesso em: 2018.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification**. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Canadian, v. 37, p. 911-917, 1959.

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUECCI, H.B.; PACHECO, M.T. B.; BALDINI, V.L.S. **Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 4, n. 411, p. 1-8, 2001.

BRANDELLI, A.; DAROIT, A.J.; CORRÊA, A. P. F. **Whey as source of peptides with remarkable biological activities**. Food Research International, v. 73, p. 149-161, 2015.

BRANS, G.; SHROEN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. **Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges**. Journal of Membrane Science, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais**. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998 (Versão Republicada - 30.03.1998). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/showAct.php>. Acesso em: 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Projeto de Instrução Normativa que estabelece os padrões de identidade e qualidade de soro de leite**. Portaria Nº 53, De 10 De Abril De 2013. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 2017.

BRASIL. Resolução Da Diretoria Colegiada – **RDC Nº 135, De 8 De Fevereiro De 2017** (Publicada no DOU nº 29, de 9 de fevereiro de 2017). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2955920/RDC_135_2017_.pdf/ac21ecc5-b439-4872-8a11-01cbef2d3d51.

CALDEIRA, L. A.; FERRÃO, S. P. B.; FERNANDES, S. A. DE A.; MAGNAVITA, A. P. A.; SANTOS, T. D. R. **Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala**. Cienc. Rural [online], v.40, n.10, p. 2193-2198, 2010. ISSN 0103-8478. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000176>. Acesso em: 2018.

CARBONARI, K. A. **Avaliação do Potencial Antioxidante (In vitro e In vivo) e Antiinflamatório de Ouratea parviflora, Polymnia sonchifolia e Marlierea obscura**. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Santa Catarina. 108 p., 2005.

CARVALHO, J. M. **Recuperação de Ácido Láctico por Filtração Tangencial**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Técnica de Lisboa, 110 p, 2008.

CASSANEGO, D. B.; GUSSO, A. P.; MATTANNA, P.; DA SILVA, S. V.; DE PELLEGRINI, L.G. **Características físico-químicas e sensoriais de bebida láctea de leite de cabra**. Anais do XV Simpósio Paranaense de Ovinocultura, III Simpósio Paranaense de Caprinocultura, III Simpósio Sul Brasileiro de Ovinos e Caprinos. Anais. Pato Branco, PR, 2012.

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

CHAUFER, B., MEIRELES-MASBERNAT, M.; AIMAR, P. **Géométrie des modules. In Les Séparations par membrane dans les procédés de L'industrie Alimentaire**. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Paris, p. 8–66, 1998.

CHIU, C.; SU, L.H.; CHU, C. **Salmonella enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment**. Department of Pediatrics, Chang Gung Children's Hospital, Chang Gung University College of Medicine, Taoyuan, Taiwan. Clinical Microbiology Reviews. v.17, n. 2, p. 311-322, 2004.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J. G.; MEIRA, S. M. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. **Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 91, p. 2247-2254, 2011.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. **Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities**. Peptides (New York, N.Y. 1980). v. 61, p. 48-55, 2014.

CORTEZ, N. M. S. **Diagnóstico da produção do soro de queijo no estado do Rio de Janeiro**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

CRUZ, A.; OLIVEIRA, C.; SÁ, P.; CORASSIN, C. H. **Processamento de Leites de Consumo. Coleção Lácteos**. Sindicato Nacional dos Editores de Livros –RJ. v. 2, 2017.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. **Listéria monocytogenes: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil**. (ISSN 0103-4235). Alimentos e Nutrição, v.19, n. 2, p.195-206, 2008.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. **Espectrometria de massa de proteínas – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica**. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Brasília, ano IX, n. 36, p. 40-46, 2006.

DALLAS, D.C.; WEINBORN, V.; DE MOURA BELL, J.M.L.N.; WANG, M.; PARKER, E.A.; GUERRERO, A.; HETTINGA, K.A.; LEBRILLA, C.B.; GERMAN, J.B.; BARILE, B. **Comprehensive peptidomic and glycomic evaluation reveals that sweet whey permeate from colostrum is a source of milk protein-derived peptides and oligosaccharides**. Food Research International, v. 63, p. 203-209, 2014.

DÁVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOMÉ, B.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. **Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis**. Journal of Food Protection, v. 67, p. 1939-1944, 2004.

DE LA FUENTE, M. A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P.A.; SIGH, H. **Processinduced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates**. International Dairy Journal, v. 12, p.361-369, 2002.

DIAS, D. R.; VILELLA, D.M.; SILVESTRE, M.P.C; SCHWAN, R.F. **Alkaline protease from Bacillus sp. Isolated from coffee bean grown on cheese**

whey. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 24, p. 2027-2034, 2008.

DE WIT, J.N. **Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products.** Journal of Dairy Science, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. **Novas tecnologias de preservação:** Possibilidades e limitações. International Dairy Journal, v. 14, n. 4, p. 273-285, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002>. Acesso em: julho, 2017.

DRYÁKOVÁ , A.; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; CURDA, L.; KORHONEN, H. J. T. **Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods.** European Food Research and Technology, v.230, p. 865 – 874, 2010.

EL-ZAHAR K., SITOHY M., CHOISSET Y., MÉTRO F., HAERTLÉ T., CHOBERT J.-M. **Peptic hydrolysis of ovine b-lactoglobulin and a-lactalbumin. Exceptional susceptibility of native ovine b-lactoglobulin to pepsinolysis.** International Dairy Journal, v. 15, p. 17- 27, 2005.

EPA, Environmental Protection Agency. **Low pressure membrane filtration for pathogen removal.** Cincinnati: (EPA 815-C-01-001). 2001.

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

FARRO, A. P. C.; VIOTTO, L. A. **Redução do teor de gordura do soro de queijo pré-tratado por ultrafiltração.** 4º Congresso Ibero-americano em ciência e tecnologia de membranas. Florianópolis. CITEM, 2003.

FERREIRA, D.F. **Estatística básica.** Lavras: UFLA, 2 ed. 664 p., 2009.

FIALHO, T. L. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo Minas Artesanal da Canastra**. Dissertação (mestrado acadêmico) UFLA, 97 p. 2015.

FOOD CHEMICALS CODEX, 4th. USA: National Academic Press/Chapman e Hall, 1996, p. 811-812.

FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., MCSWEENEY, P.L.H. **Chemistry of milk constituents**. In: Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, p. 19–44, 2000.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. First Edition, London: Thomson Science, 378 p. 1998.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. B. **Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos**. Arquivos de Gastroenterologia, v. 36, n.4, p. 227-237, 1999.

GARCIA-MORA, P.; PEÑAS, E.; FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C. **Savinase the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. *Castellana*) protein concentrates with multifunctional properties**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 62, n. 18, 2014.

GARCÍA-PÉREZ, F. J.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SENDRA, E. **Effect of orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage**. Color Research and Application, v. 30, n. 6, p. 457-463, 2005.

GIACOBBO, A.; RODRIGUES, M. A. S.; BERNARDES, A. M.; FERREIRA, J. Z.; MENEGUIZZI, A. **Microfiltração aplicada ao tratamento de efluentes de curtume**. In: Simpósio Internacional De Qualidade Ambiental. Porto Alegre, Anais. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2010.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. **Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics**. Central European Journal of Biology, v. 2, p. 1–33, 2007.

GIRALDO-ZUÑIDA, A. D.; COIMBRA, J. R.; GOMES, J. C. MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G.; GADE, A. D. **Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo**. Revista Instituto Lático Cândido Tostes, v. 59, p. 53-66, 2004.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C.G. **Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactives peptides**. International Journal of Dairy Technology, v. 57, n. 2/3, p. 173-188, 2004.

GRANATO, D.; MASSON, M. L. **Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, vol. 30, n. 4, p. 1090-1096, 2010.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processo de separação com membranas**. Rio de Janeiro. E-papers Serviços Editoriais Ltda, 1 ed., 2006.

HAENLEIN, G.F.W.; WENDORFF, W.L. Sheep milk. Chapter 3. In: **Handbook of Milks of Non-bovine Mammals**. PARK, Y.W; HAENLEIN, G.F.W. ed. Blackwell Publishing, p. 137- 194. 2006.

HAHN, R.; SCHULZ, P.M.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. **Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography**. Journal of Chromatography. v.795, p. 277–287, 1998.

HALL, C.A.; CUPPET, S. L. **Structure activities of natural antioxidants**. In: **Antioxidant Methodology in vivo concepts**. Aruoma 01, Cuppet (eds). Champaign, IL, p. 2-29, 1997.

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

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. **Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana.** Revista de Nutrição, v.19, n. 4, p. 479-88, 2006.

HASAN, A.; PELUSO, C. R.; CASCO, T. S.; FIESCKO, J.; CHATTERJEE, S. G. **A surface-renew all model of cross-flow microfiltration.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 30, n. 1, p. 167-186, 2013.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ B.; AMIGO, L. **Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Alpha-lactalbumin and Beta-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 53, p. 588–593, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., RAMOS, M; GOMEZ-RUIZ, J.A. **Bioactive components of ovine and caprine cheese whey.** Small Ruminant Research. v. 101, No. 1, p. 196-204, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; RECIO I.; AMIGO, L. **Effect of β -Lactoglobulin Hydrolysis with Thermolysin under Denaturing Temperatures on the Release of Bioactive Peptides.** Journal of Chromatography A, v. 1116, n. 1-2, p. 31-37, 2006.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, L. B.; RECIO, I.; AMIGO, L. **β -lactoglobulin as Source of Bioactive Peptides.** Journal Amino Acids, v. 35, n. 2, p. 257-265, 2008.

HUFFMAN, L. M. **Processing whey protein for use as a food ingredient.** Food Technology, Chicago, v. 50, p. 49-52, 1996.

HUFFMAN, L. M.; FERREIRA, L. D. B. **Whey - based Ingredients.** In: CHANDAN, R. C.; KILARA, A. (Eds.). Dairy Ingredients for Food Processing. 1. ed. Ames: Blackwell Publishing. p. 179–198, 2011.

IDF/FIL, International Dairy Federation. **Cheese and processed cheese products. Determination of fat content gravimetric method (reference method).** IDF – FIL 5 – B: p. 7, 1986.

IUPAC, Reino Unido. **Terminology for membranes and membrane processes.** International Union of Pure and Applied Chemistry, v. 68, n. 7, p. 1479-1489, 1996.

JEEWANTHIKIM, R. K. C.; KIM, M. H.; LEE, N. K.; YOON, Y. C. e PAIK, H.D. **Peptide Analysis and the Bioactivity of Whey Protein Hydrolysates from Cheese Whey with Several Enzymes.** Korean Journal for Food Science of Animal Resources. Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 05029, Korea. Biology Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 05029, Korea. Anais 37. P. 62-70, 2017. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.62>.

KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; TSATSAKIS, A.M.; SPANDIDOS, D. A.; TAITZOGLU, I.; KOURETAS, D. **Effects of sheep/goat whey protein dietary supplementation on the redox status of rats.** Article in Molecular Medicine Reports. V. 17, n. 4, p. 5774-5781, 2018.

KILDUFF, J. E.; MATTARAJ, S.; PIERACCI, J.P.; BELFORT, G. **Photochemical Modification of Poly(ethersulfone) and Sulfonated Poly(sulfone) Nanofiltration Membranes for Control of Fouling by Natural Organic Matter, Desalination.** *Science Direct*, v.132, p. 133-142, 2000.

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

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Review in *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAUTENSCHLAGER, R. S.; FILHO, S. S. F.; PEREIRA, O. **Modelação matemática e otimização operacional de processos de membrana de ultrafiltração**. Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental. v. 14, n. 2, p. 215-222, 2009.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger: princípios da bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 4 ed., 2006.

LAHOV, E.; EDELSTEN, D.; SODE-MORGENSEN, M. T.; SOFER, E. **Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat**. Milchwissenschaft, v. 26, p. 489–495, 1971.

LEIDENS, N. **Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por UF e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

LÖNNERDAL, B. **Nutritional and physiologic significance of human milk proteins**. American Journal of Clinical Nutrition, v. 77, n. 6, p. 1537-43, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin Phenol Reagent**. Journal Biology Chemistry. v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C. **Alternativas tecnológicas para o controle ambiental em pequenas e médias indústrias de laticínios**. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais. Porto Alegre, v. 27, 2000.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. **Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins**. Journal of Dairy Science, v. 93, p. 437–455, 2010.

MARTINS, E. **Manual Técnico na Arte e Princípios da Fabricação de Queijos**. Paraná, 101p, 2000.

MCCLEMENTS, D.J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. Washington: CRC Press, 2005.

METCALF, EDDY. Inc. **Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse**. 4. ed. New York, McGraw - Hill Book, 1815 p., 2003.

MILLER G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426, 1959.

MILLER, G. D.; JARVIS, J.K.; MCBEAN, L.D **Handbook of Dairy Products and Nutrition.**, CRC Press LLC, Lllinois, 2 ed., 2000.

MINERVINI F.; ALGARON F.; RIZZELLI C.G.; FOX. PF.; MONNET V.; GOBBETTIM. **Agiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species**. American Society for Microbiology, v. 69, n. 9, p. 5297-305, 2003.

MINOLTA. **Precise color communication: color control from feeling to instrumentation**. Ramsey: Minolta Corporation Instrument Systems Division. 49 p. 1994.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. **Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas**. In: Monge A., Ganellin, C. R. (ed.) Pratical Studies for Medicinal Chemistry IUPAC, p. 1-14, 2006.

MOOLER, N.P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. **Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects**. European Journal of Nutrition, v. 47, p. 171-182, 2008.

MORA, G.; PEÑAS E.; FRIAS, J.; GOMEZ, R.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C. **High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins.** Food Chemistry, v. 171, p. 224–232, 2015.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. E.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. **A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure.** Journal of Food Science, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2 ed., 564 p., 1996.

MYERS, D. V.; RICKS, E.; WILKINSON, M.; IACOBUCCI, G. A. **Chemical and nutritional evaluation of enzymatic soybean hydrolysates.** The IV International Congress of Food Science and Technology. Madrid Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos Valencia, v. 5, p. 96-102, 1974.

OLIVEIRA, A. **Fracionamento das proteínas do soro de leite por meio de agregação proteica combinada com processos de separação por membranas.** Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Escola De Engenharia Departamento De Engenharia Química Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Química. Dissertação. 147 p, 2017.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Artmed. 279 p., 2005.

ORSI, N. **The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives.** Biometals, v. 17, p. 189-196, 2004.

PACHECO, M. T. B.; ANTUNES, A. E. C. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência.** São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1 ed. p.271-290, 2009.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. **Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir**

de concentrados protéicos de soro de leite. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000200026>. Acesso em: junho, 2017.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; RESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. **Obtenção De Concentrados Protéicos De Soro De Leite E Caracterização De Suas Propriedades Funcionais Tecnológicas.** Revista de Alimentação e Nutrição Araraquara, v. 20, n. 2, p. 231-239, 2009.

PANIZZOLO, L. A. Modificación de proteínas por vía enzimática. **Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis.** Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay. 2005.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, V.; BRAMAG, W.; FELLEBERG, R.V. **Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule.** Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1426, p. 439-448, 1999.

PELLEGRINI, A. DETTLING, C.; THOMAS, L.; HUNZIKER, P. **Isolation and characterization of bactericidal domains in the β -lactoglobulin.** Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1526, p. 131-140, 2001.

PEÑAS, E., SNEL, H., FLORIS, R., PRÉSTAMO, G., GOMEZ, R. **High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates.** International Dairy Journal, v. 16, p. 969–975, 2006.

PEPPIN, S. S. L.; ELLIOT, J. A. W. **Non-equilibrium thermodynamics of concentration polarization.** Advances in Colloid and Interface Science, Amsterdam, v. 92, p. 1 – 72, 2001.

PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J. L. **Preparation and characterisation of whey protein hydrolysates.** Applications in industrial bioconversion processes. Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 418-423, 1993.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. **Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs**. PLOS Pathogens, v. 6, n. 10, p. 1-4, 2010.

PILBROW, J.; BEKHIT, A. E. A.; CARNE, A. **Fractionation of sheep cheese whey by a scalable method to sequentially isolate bioactive proteins**. Food Chemistry. V. 203, p. 165-174, 2016.

PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. **Hydrolysis of ovine, caprine and bovine whey proteins by trypsin and pepsin**. *Bioprocess Engineering*. v. 23, p. 275-282, 2000.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. **Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n.1, p. 179-187, 2006.

POLTRONIERI, P.; CAPPELLO, M. S. D'URSO, O. F. **Bioactive Peptides with Health Benefit and their Differential Content in Whey of Different Origin. Whey: Types, Composition and Health Implications**. Nova Publisher, Hauppauge, New York. p. 1-16, 2012.

POPPI, F. A.; COSTA, M. R. **Whey and its proteins: composition and functional activity**. UNOPAR. Ciências Biológicas Saúde. v. 12, n. 2, p. 31-7. 2010.

PRECI, D.P.; CICHOSKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L. **Desenvolvimento De Iogurte Light Com Extrato De Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil) E Adição De Probióticos**. Revista de Alimentos e Nutrição, Araraquara v. 22, n. 1, p. 27-38, 2011.

RAMOS, M.; JUAREZ, M.; Sheoo Milk. Int: FUQUAY, J.W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Elsevier, 2 ed., v. 3, p. 494-502, 2011.

RAO, M.B.; TANSALE, A. M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RECIO I., VISSER S. **Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: A comparative study**. International Dairy Journal. v. 10. p. 597– 605, 2000.

REED, G. **Enzymes in food processing**. London: Academic Press, 2 ed., 573 p., 1975.

RENHE, I.R.T. **O papel do leite na nutrição**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 63, n.363, p. 36-43, 2008.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücler, Instituto Mauá de Tecnologia, 184 p., 2004.

RICE, G.S.; KENTISH, S. E.; O`CONNOR, A.J.; BARBEIRO, A. R.; PIHLAJAMAKI, A.; NYSTROM, M.; STEVENS, G.W. **Analysis of separation and fouling behaviour during nanofiltration of dairy ultrafiltration permeates**. Desalination. v. 236, p. 23-29, 2009.

RIZZELLO C. G.; LOSITO I.; GOBBETTI M.; CARBONARA T.; DE BARI M. D.; ZAMBONIN P. G. **Antimicrobial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties**. Journal of Dairy Science. v. 88, n. 7, p. 2348-60, 2005.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food**. Food Chemistry, v. 92, p.235-254, 2005.

SABADIN, I., VILLAS-BOAS, M., ZOLLNER, R. L., NETTO, F. M. **Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with**

transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. European Food Research and Technology, v.235, n.5, p.801-809. 2012.

SALZANO, Jr. I. **Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension.** Symposium series 007; São Paulo. p.75-202, 2002.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte: FEPMUZ, 2 ed., 265 p., 2002.

SANTOS, M.H. **Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (Coffea arabica).** Química Nova. v. 30, n. 3, p 604-610, 2007.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTYIA, M. T. **Membranas Filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reúso.** São Paulo: ABES, 233 p, 2001.

SEGUENKA, B. **Produção de concentrado proteico e lactose de soro de leite por processos de separação por membranas.** Dissertação de mestrado. Universidade De Passo Fundo Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Tecnologia De Alimentos. Passo Fundo, 2016.

SERPA, L. **Concentração de Proteínas em Rejeitos de Queijarias.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Erechim, RS, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Propriedades fisiológicas - proteínas das proteínas do leite.** ISSN 1415-5273. Revista de Nutrição. v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001>. Acesso em: 2018.

SHI, X; TAL, G.; HANKINS, N.P.; GITIS, V. **Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes:** A review. Journal of Water Process Engineering, v.1, p.121-138, 2014.

SILVA, L. C. **Determinação da Composição química e de Compostos Bioativos em Cogumelos Comestíveis**. Programa de Pós graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB. Itaperinga-BA. 2013.

SILVA, M.C.; SILVA, V.D.M.; LANA, A.M.Q.; SILVESTRE, M.P.C. **Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado protéico do soro de leite**. Alimentos e Nutrição, v. 20, p. 395-402, 2009.

SMITHERS, G. W. **Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow**. International Dairy Journal, v. 48, p. 2-14, 2015.

SNAPE, J. B.; NAKAJIMA, M. J. **Processing of agricultural fats and using membrane technology**. Journal of Food Engineering, v. 30, p. 1-41, 1996.

STORRY, J. E.; GRANDISON, A. S.; MILLARD, D.; OWEN, A. J.; FORD, G. D. **Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants**. Journal of Dairy Research's. v. 50, p. 215–229, 1983.

STUBBS, A.; ABUD, G.; BENCINI, R. **Dairy Sheep Manual** - Farm Management Guidelines. Kingston: RIRDC, 69 p., 2009.

TASHIMA L.; SAMARA S. C.; ANDREA J. S. D. G. C.; JORDÃO, I. M. **Análise comparativa da composição centesimal do soro de leite bovino, caprino e ovino. Simpósio sobre inovação na Indústria de lácteos**. Campinas, SP. 2013. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br>. Acesso em: 2015.

TENOVUO J. **Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety oral Diseases**. v. 8, p. 23-29, 2002.

THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. **Milk protein: from expression to food**. New Zealand: Massey University, 561 p., 2009.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Guaíba: UFSM. 4 ed., 206 p, 2010.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria: UFSM, 5 ed. 2013.

TSAKALI, E.; PETROTOS, K.; D'ALESSANDRO, A.G.; MANTAS, C.; TRIPOLITSIOTIS, I.; GOULAS, P.; CHATZILAZAROU, A.; VAN IMPE, J. F. **Exploring the Effect of Ultrafiltration/Diafiltration Processing Conditions on the Lactoferrin and Immunoglobulin G Content of Feta Whey Protein Concentrates**. Journal of Food Process Engineering. v. 38, 4 ed., p. 363-373, 2015.

VAN DER VEM, C.; GRUPEN, H.; BONT, D.B.A.; VORAGEN, A.G.J.; **Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology**. International Dairy Journal, v. 12, p. 813-20, 2002.

VIDAL, C. M. DE S.; CAMPOS, J. R. **Coagulação associada à microfiltração para o tratamento avançado de esgoto sanitário**. Revista Ambiente, v. 5, n. 1, p. 101-114, 2009.

VILJANEN, K.; KIVIKARI, R.; HEINONEN, M. **Inhibition of Protein and Lipid Oxidation in Liposomes by Berry Phenolics**. Journal of Agricultural and Food Chemistry – v. 52, n 24, p. 7419-7424, 2004.

WAKAYABASHI, H.; TAKASE, M.; TOMITA, M. **Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin**. Current Pharmaceutical Design, v. 9, p. 1277-87, 2003.

WAL, J. M. **Structure and function of milk allergens. Allergy:** European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement, v.56, n.67, p.35-38. 2001.

WAL, J. M. **Bovine milk allergenicity.** Annals of Allergy, Asthma & Immunology, v.93, n.5, Supplement 3, p. 2-11, 2004.

WELSH, G.; RYDER, K.; BREWSTER, J.; WALKER, C.; MROS, S.; EL-DIN, A.; BEKHIT, A.; MCCONNELL, M.; CARNE, A. **Comparação de peptídeos bioativos preparados a partir de soro de queijo de ovelha usando uma preparação bacteriana de grau alimentício e uma protease fúngica.** 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13392>. Acesso em: 2018.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, p.63-115, 1994.

WIBISONO, Y.; CORNELISSEN, E.R.; KEMPERMAN, A.J.B.; DER MEER, W.G.J.V.; NIJMEIJER, K. **Two-phase flow in membrane processes: A technology with a future.** Journal of Membrane Science, v. 453, p. 566-602, 2014.

WONG, D.W.S.; CARMIRAND, W.M.; PAVLAT, A.E. **Structures and functionalities of milk proteins.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

YADA, R. Y. **Protein in Food Processing.** England: Woodhear Publishing, 2004.

YADAV, J. S. S. et al. **Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides.** Biotechnology Advances, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

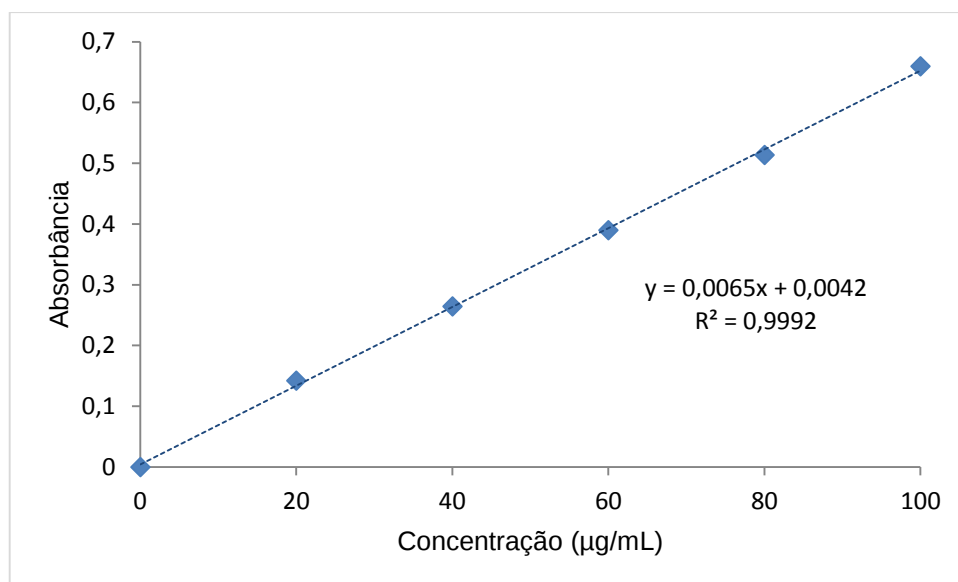
YEE, K. W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. **Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions.** Journal of Membrane Science, v. 290, n.1-2, p. 125–137, 2007.

YEUNG, A. T.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK R. E. **Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications**. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 68, p. 2161–2176, 2011.

ZHAO X.; WU H.; HAIRONG L.; LI G.; HUANG Q. **LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides**. PLOS One. 8: e66557. doi: 10.1371 / journal.pone.0066557. 2013.

APÊNDICE A

No Apêndice A, está apresentada a equação da reta a partir do equivalente em tirosina liberado através da curva padrão.

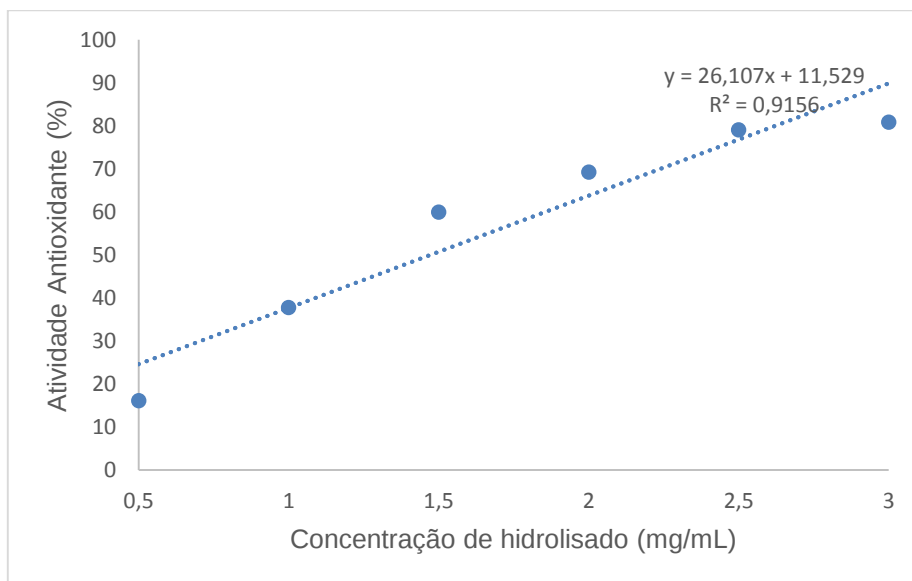


Fonte: O autor (2018).

APÊNDICE B

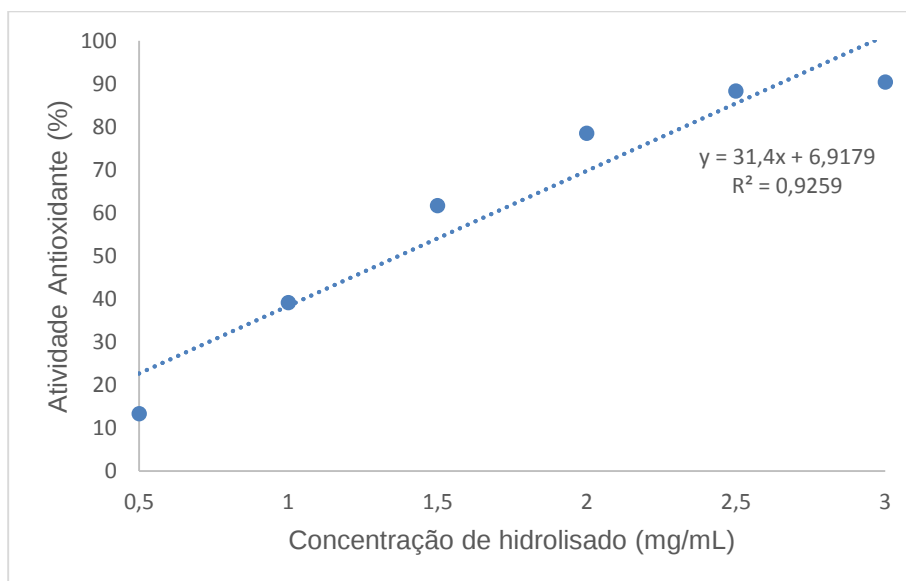
No Apêndice B estão demonstradas as atividades antioxidante em diferentes tempos de hidrólise (2, 3, 4, 5 e 6 h) para obtenção do IC₅₀, em relação a concentração de hidrolisado.

Figura A.1. Equação da reta da atividade antioxidante em 2 h de hidrólise.



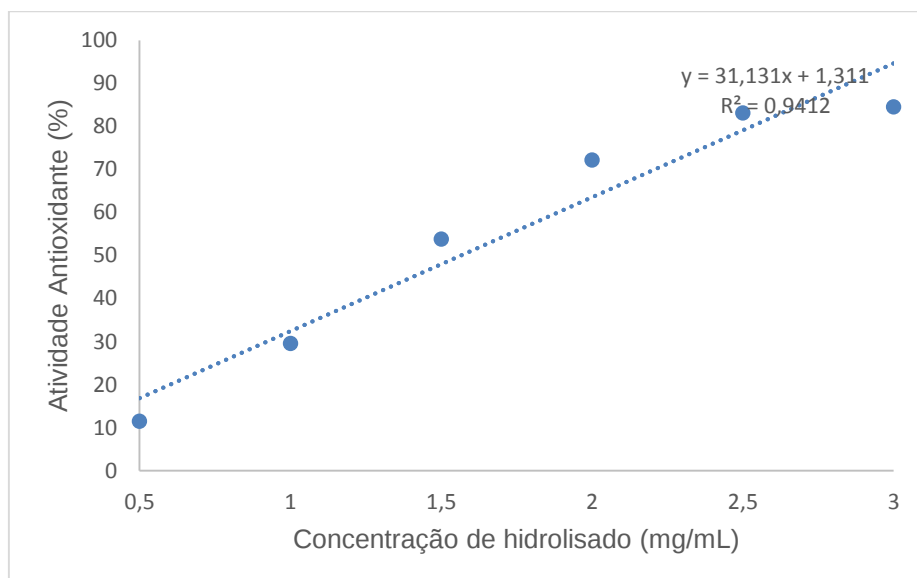
Fonte: O autor (2018).

Figura A.2. Equação da reta da atividade antioxidante em 3 h de hidrólise.



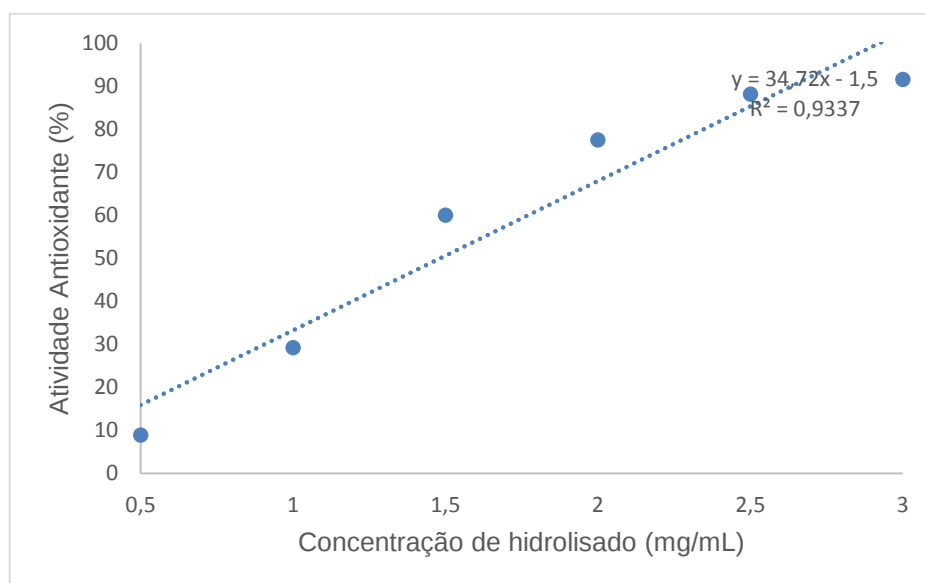
Fonte: O autor (2018).

Figura A.3. Equação da reta da atividade antioxidante em 4 h de hidrólise.



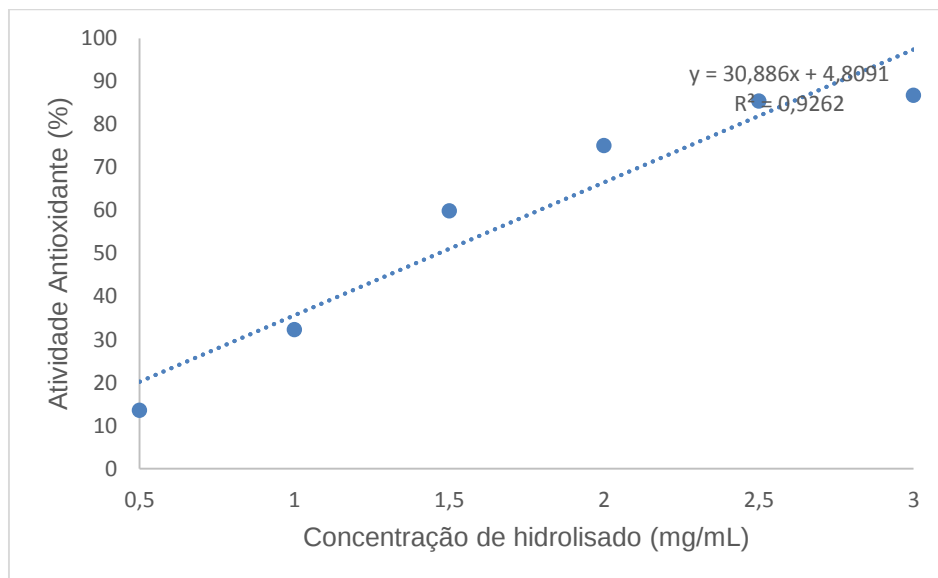
Fonte: O autor (2018).

Figura A.4. Equação da reta da atividade antioxidante em 5 h de hidrólise.



Fonte: O autor (2018).

Figura A.5. Equação da reta da atividade antioxidante em 6 horas de hidrólise.



Fonte: O autor (2018).