

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS PRESENTES NO LEITE DE CABRA

Thaís Susana Marinho Carneiro^{1*}, Paula Perazzo de Souza Barbosa², Tatiane Santi Gadelha³

1. Estudante de IC de Ciências Biológicas da UFPB

2. Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB

3. Professora do Departamento de Biologia Molecular da UFPB / Orientadora

Resumo:

As proteínas do leite apresentam propriedades *in vivo* devido aos peptídeos bioativos, que são inativos quando dentro da sequência protéica original. Com o objetivo de avaliar o perfil protéico das caseínas do leite caprino e de peptídeos formados a partir da hidrólise enzimática, as proteínas do leite foram fracionadas por precipitação isoelétrica, e foram quantificadas pelo método de Bradford. A hidrólise *in vitro* das caseínas foi feita com pepsina seguida de tripsina. Os perfis protéicos e peptídicos foram determinados por eletroforeses SDS-PAGE e Tris-Tricina, respectivamente. A atividade antibacteriana foi testada com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O perfil protéico do leite evidenciou a presença das principais proteínas do leite, e o perfil eletroforético do hidrolisado constatou a eficácia na formação de peptídeos. A fração caseínica apenas inibiu o crescimento bacteriano da *Escherichia coli*, e o hidrolisado inibiu todas as demais cepas.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Caseína; Hidrólise.

Apoio financeiro: CNPq/UFPB.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFPB

Introdução:

O leite caprino tem alto valor biológico e nutritivo, e suas proteínas apresentam benefícios já reconhecidos à saúde humana, motivo decisivo para o aumento do seu consumo. Ademais, tal produto é de fácil digestibilidade e hipoalergênico (BEZERRA, 2011; PALATNIK et al., 2015), além de contribuírem para as propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos (CÁNOVAS et al., 2011; BERRY et al., 2014).

Estima-se que cerca 80% de toda a fração proteica do leite é formado pelas caseínas, que são fosfoproteínas de alto valor nutricional para os mamíferos em crescimento por serem fonte de cálcio, fosfato e aminoácidos. São classificadas em quatro tipos: caseínas α_1 , α_2 , β e κ (LIRA et al., 2010; BEZERRA, 2011).

As proteínas do leite podem apresentar interessantes propriedades *in vivo* mediante os peptídeos bioativos, que são inativos quando dentro da sequência protéica original. Muitos estudos têm explorado peptídeos no leite de diferentes espécies de mamíferos, que podem ser liberados *in vivo*, durante a digestão gastrointestinal, ou *in vitro*, através da fermentação do leite ou ação de enzimas gastrointestinais (SALAMI et al., 2008; PEREIRA, 2014).

A abordagem da hidrólise enzimática para a liberação de peptídeos a partir da proteína intacta viabiliza a otimização do rendimento destas biomoléculas por possibilitar a escolha do substrato, das enzimas específicas e das condições de reação (ESPEJO-CARPIO et al., 2013). O uso de enzimas proteolíticas na produção destes peptídeos tem sido feito em pesquisas *in vitro*, na hidrólise do leite de várias espécies, inclusive no caprino (AHMED et al., 2015). Dessa forma, os peptídeos derivam de fontes inofensivas e baratas, com potencial a ser empregado na medicina e na indústria alimentícia (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015).

Com pesquisas realizadas *in vitro* e em modelos animais, os estudiosos relataram que peptídeos derivados de caseínas apresentam potencial atividade biológica. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil protéico do leite caprino e a atividade antibacteriana das caseínas e de peptídeos formados a partir da hidrólise enzimática dessas proteínas.

Metodologia:

As amostras de leite caprino foram obtidas de um rebanho homogêneo de cabras com ± 30 dias de lactação do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias da UFPB, Campus III, município de Bananeiras / PB. O fracionamento das proteínas do leite, previamente desnatado por centrifugação (NT 815 Novatecnica), foi feito por precipitação isoelétrica, mediante adição de ácido clorídrico 1 M até atingir o pH 4,1 (CEBALLOS et al., 2009). O precipitado obtido, equivalente à fração caseínica (FCN), foi dialisado contra água destilada, congelado a -4 °C, e liofilizado (L101, Liotop). As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), medida com absorvância de 595 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro Amersham, Biosciences).

A hidrólise enzimática *in vitro* da FCN foi realizada segundo a metodologia de Ahmed et al. (2015), com pepsina seguida de tripsina. A FCN liofilizada foi solubilizada em água destilada, com pH aferido para 2

(pHmetro PHTEK), foi aquecida em banho-maria por 5 min., e incubada com a pepsina, na proporção 1:50, durante 30 min., a 37 °C, sob agitação constante (150 rpm). Após esse tempo, a amostra teve o pH aferido para 8,0, para adição da tripsina. A amostra foi incubada por mais 1 h, a 37 °C, sob agitação constante (150 rpm). Findo o tempo, a reação foi inativada por aquecimento a 85 °C por 15 min.

Para a estabelecer do perfil proteico do leite, foi utilizada SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com o gel de separação contendo 17,5% de poliacrilamida. O perfil peptídico foi estabelecido por eletroforese Tris-Tricina, como descrito por Schägger; Jagow (1987). Os marcadores utilizados nos dois tipos de eletroforese foram de alto e baixo peso molecular (GE Healthcare Life Sciences).

A atividade antibacteriana foi feita através da técnica de microdiluição com as cepas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Cada cepa foi colocada para crescer em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), a 37 °C, por aproximadamente 18 h. Para o teste foram usadas microplacas de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) de fundo chato com 96 poços. Foram distribuídos 90 µL do meio BHI em todos os poços, e 90 µL da amostra (FCN e hidrolisado, ambos solubilizados em água, 3 mg/mL) na linha A da placa. Desta mistura foram feitas diluições seriadas em triplicata. Em seguida, foram adicionados 10 µL de suspensão bacteriana (10^6 UFC mL⁻¹) em cada poço contendo a amostra diluída no meio. Foram feitos dois controles, o negativo (apenas o meio), e positivo (bactéria e o meio). O material foi incubado a 37 °C em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo scientific), e o crescimento bacteriano monitorizado pela medida da absorbância a 625 nm, a cada 60 minutos, durante 18 h. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e analisados utilizando-se o teste T de Student no GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Softwar Inc., San Diego CA, E.U.A).

Resultados e Discussão:

Após a leitura a 595 nm da FCN caprina, obteve-se o resultado de 34,37 mgP/mL (mgP = miligramas de proteína). Por meio da SDS-PAGE pode-se detectar as principais proteínas do leite caprino, tanto da FCN como do soro (Figura 1).

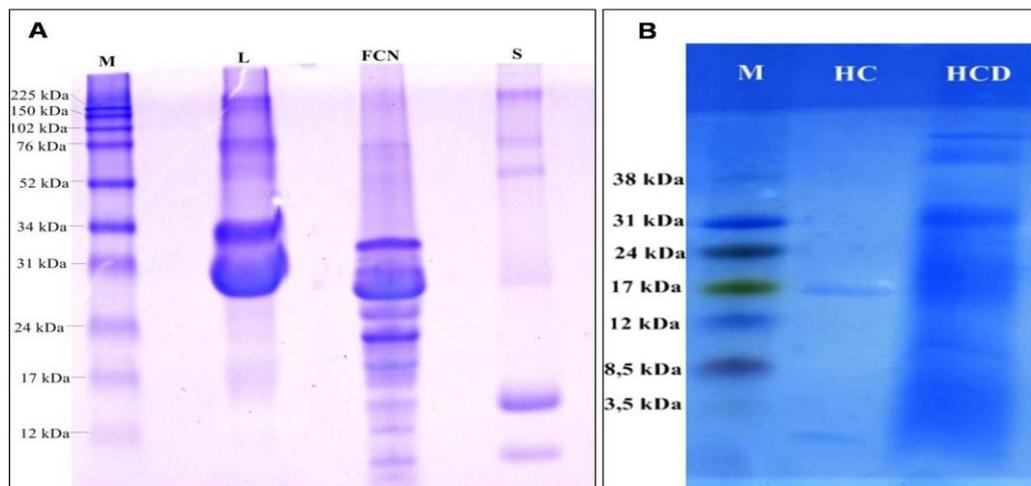


Figura 1: Perfil eletroforético do leite caprino e hidrolisados das caseínas. Em A: SDS-PAGE do leite caprino, fração caseínica e soro caprino. M: Marcador molecular, L: Leite caprino, FCN: Caseína do pico de lactação, S: Soro. Em B: SDS-PAGE do hidrolisado caseínico, mostrando o perfil dos peptídeos formados. M: Marcador de baixo peso molecular, HC: Hidrolisado caseínico pH 8,0 não dialisado, HCD: Hidrolisado caseínico pH 6,0 dialisado .

O peso molecular das caseínas (fig 1A) α -s-, β - e κ foram estimados em aproximadamente 34,0; 31,1 e 24 kDa; e das soroproteínas, em torno de 17 e 12 kDa. No soro, pode-se verificar a presença da lactoferrina, BSA, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. Na FCN verificou-se uma concentração mais acentuada nas bandas representativas como está evidenciado no trabalho de Egito (2006) e a β caseína no estudo de Meurer (2014) e Egito (2006).

Na eletroforese Tris-Tricina (fig 1B), certificou-se a eficácia da hidrólise realizada com a FCN caprina com as enzimas pepsina e tripsina, quando comparada à fração com as proteínas nativas. Na análise, pode-se constatar bandas de aproximadamente 17 kDa, e inferior a 3,5 kDa; e em HC para HCD uma maior solubilidade dos peptídeos com pesos moleculares com cerca de 31, 17, e 8,5 kDa, diferenças essas devido ao rearranjo por pH.

O desenvolvimento das populações de bactérias no meio de cultura do material incubado foi analisado durante 18 h, através de determinação de densidade óptica, forma para determinar a concentração de biomassa de organismos unicelulares. A partir desse monitoramento, certificou-se que a ação da FCN e de seu hidrolisado frente às bactérias Gram-positivas e negativas foi diferente.

Com relação à *E. coli*, a FCN caprina teve efeito sobre seu crescimento, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 3 mg/mL, diferentemente do hidrolisado, cujo efeito foi com CMI de 1 mg/mL, o que pode ser constatado a partir da redução das absorbâncias em função do tempo (Gráfico 1).

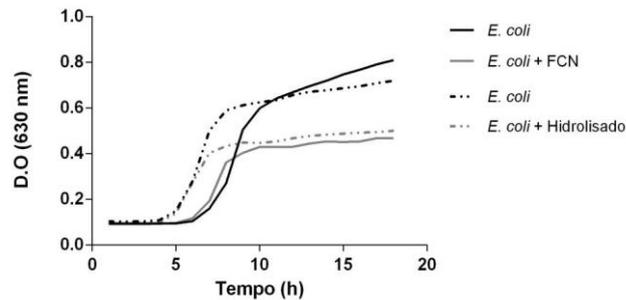


Gráfico 1: Efeito da FCN e do hidrolisado sobre o crescimento de *E. coli*. O gráfico apresenta a leitura das densidades ópticas a 630 nm em função do tempo avaliado.

No gráfico 2 são mostrados os efeitos das amostras utilizadas no estudo sobre *P. aeruginosa*. A FCN não apresentou efeito sobre o crescimento dessa bactéria, porém o hidrolisado sim, com CIM de 1 mg/mL.

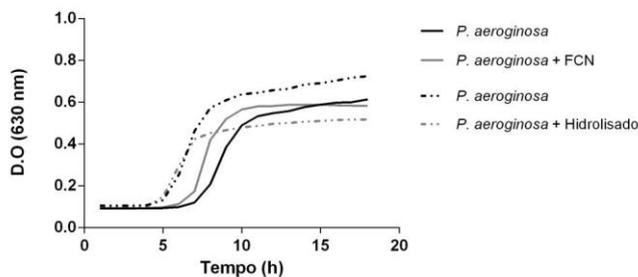


Gráfico 2: Efeito da FCN e do hidrolisado sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. O gráfico apresenta a leitura das densidades ópticas a 630 nm em função do tempo avaliado.

Quanto à *S. aureus*, a FCN caprina não teve efeito sobre o seu crescimento, mas o hidrolisado sim, com CIM de 1 mg/mL, a partir da redução das absorvâncias em função do tempo, como pode ser visualizado no gráfico 3.

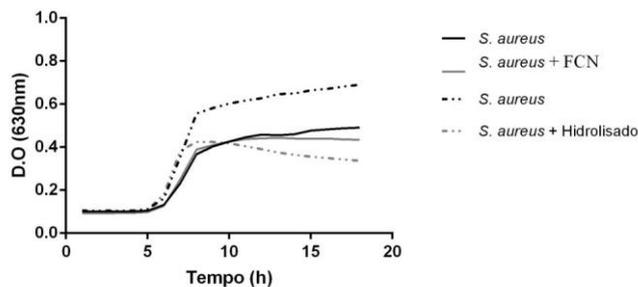


Gráfico 3: Efeito da FCN e do hidrolisado sobre o crescimento de *S. aureus*. O gráfico apresenta a leitura das densidades ópticas a 630 nm em função do tempo avaliado.

Já se sabe do potencial dos peptídeos sobre a inibição bacteriana, e em outras funções biológicas. O estudo de Murata (2013) relata que a função antimicrobiana da lactoferrina, peptídeo naturalmente presente no leite derivado da lactoferrina. Já a lactoferrina B, um peptídeo produzido através da digestão da pepsina gástrica da lactoferrina bovina, é capaz de inibir o crescimento de microorganismos como *E. coli* (MURATA et al., 2013; ESMAELPOUR et al., 2017), *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter Jejuni* (MURATA et al., 2013).

A FCN teve efeito apenas sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Já o hidrolisado obtido a partir da hidrólise com pepsina e tripsina inibiu com significância todas as bactérias utilizadas no presente trabalho. Os resultados obtidos podem ser explicados pelo fato de que as proteínas do leite possuem uma atividade fisiológica latente codificada em sua estrutura primária, por meio dos peptídeos, sequências de aminoácidos menores que, ao serem liberados da proteína nativa quando da sua clivagem durante a digestão ou fermentação, tornam-se ativos e com maior capacidade para romper membranas ou ultrapassá-las, mesmo no caso de bactérias Gram-negativas, ampliando assim o seu espectro de ação.

Conclusões:

O perfil eletroforético do leite caprino evidenciou suas principais proteínas, entre elas as caseínas α S1 e β , e o perfil do hidrolisado constatou a eficácia na formação de peptídeos. A FCN do leite caprino teve efeito apenas sobre o crescimento de *E. coli*; já o seu hidrolisado, produzido a partir da hidrólise com pepsina e tripsina, apresentou atividade antibacteriana sobre todas as bactérias testadas.

Referências bibliográficas

- AHMED, S. A. et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 44, p. 80-88, 2015.
- BERRY, S. et al. Significance, origin, and function of bovine milk proteins: the biological implications of manipulation or modification. **Milk proteins: from expression to food**, p.113-140, 2014.
- BEZERRA, V. S. Caracterização e atividade biológica de peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de caseína do leite de cabra Moxotó (*Capra hircus* Linnaeus, 1758), 2011.
- BHAT, Z. et al. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of food science and technology**, v.52, n.9, p.5377-5392, 2015.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, n.1-2, p. 248-254, 1976.
- CÁNOVAS, J. M. et al. Péptidos bioactivos. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v.23, n.5, p.219-227, 2011.
- CEBALLOS, L. S. et al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, n.4, p. 322-329, 2009.
- EGITO, A. S. et al. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.
- ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v.32, n.2, p.175-183, 2013.
- LIRA, T. B. F. et al. Evaluation of the variables that influence the enzymatic hydrolysis of Moxotó goat's milk casein. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.9, p.1036-1043, 2010.
- MEURER, V. M. Estudo comparativo entre as técnicas de eletroforese em gel de poli(acrilamida) ureia-page e lab-on-a-chip para a detecção de fraude do leite de cabra pela adição de leite bovino, 2014.
- MURATA, M. et al. Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. **Journal of dairy science**, v.96, n. 8, p.4891-4898, 2013.
- PALATNIK, D. R. et al. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation. **LWT-Food Science and Technology**, v.63, n.1, p.331-338, 2015.
- PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v.30, n.6, p.619-627, 2014.
- SALAMI, M. et al. Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. **International Dairy Journal**, v.18, n.12, p.1097-1102, 2008.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, 2004.