



**UFRPE**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ALANA EMILIA SOARES DE FRANÇA QUEIROZ

APLICAÇÃO DE ENZIMAS COAGULANTES DE LEITE DE ORIGEM FÚNGICA E  
COMERCIAL NA OBTENÇÃO DE QUEIJOS CAPRINOS MINAS FRESCAL E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SEUS PEPTÍDEOS

RECIFE - PE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ALANA EMILIA SOARES DE FRANÇA QUEIROZ

APLICAÇÃO DE ENZIMAS COAGULANTES DE LEITE DE ORIGEM FÚNGICA E  
COMERCIAL NA OBTENÇÃO DE QUEIJOS CAPRINOS MINAS FRESAL E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SEUS PEPTÍDEOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biociência Animal da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como pré-requisito necessário para a  
obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Keila Aparecida Moreira – UAG/UFRPE

RECIFE - PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

Q3a Queiroz, Alana Emilia Soares de França.  
Aplicação de enzimas coagulantes de leite de origem fúngica e comercial na obtenção de queijos caprinos Minas Frescal e avaliação da atividade biológica de seus peptídeos / Alana Emilia Soares de França Queiroz. – Recife, 2018.  
135 f.: il.

Orientador(a): Keila Aparecida Moreira.  
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2018.

Referencias.

1. Antimicrobiano 2. Antioxidante 3. Anti-hipertensiva  
4. Minas Frescal 5. Peptídeos bioativos 6. Proteases I. Moreira,  
Keila Aparecida, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de tese de doutorado de  
**ALANA EMILIA SOARES DE FRANÇA QUEIROZ**

APLICAÇÃO DE ENZIMAS COAGULANTES DE LEITE DE ORIGEM FÚNGICA E  
COMERCIAL NA OBTENÇÃO DE QUEIJOS CAPRINOS MINAS FRESCAL E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SEUS PEPTÍDEOS

Tese apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Keila Aparecida Moreira – (Presidente)  
UAG – UFRPE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Pedrosa Bezerra – (Membro interno)  
DMFA – UFRPE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniele Silva Ribeiro – (Membro externo)  
UAG – UFRPE

---

Dr<sup>ª</sup>. Lidiane Roberta Cruz da Silva – (Membro externo)  
PNPD-CAPES/UFRPE

---

Dr. João Tiago Correia Oliveira – (Membro externo)  
DCR-FACEPE/CAPES/UFRPE

RECIFE - PE

2018

Para Ernesto e Maria Emilia, por tão linda sutileza.

Para Osita e Jaime, por nosso tripé, suporte de vida...

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por dormir dentro da minha alma, brincar com meus sonhos, virando uns de pernas para o ar, para então colocar uns em cima dos outros. Por todo o seu amor. A **Jesus**, meu grande professor e exemplo. À toda **espiritualidade**, que a serviço da **Providência Divina**, ampararam-me nas dificuldades.

À **Maria Osita** e **Antônio**, meus queridos, fortes e guerreiros genitores. Vocês facilmente poderiam ser personagens dos livros de João Guimarães Rosa. A história de cada um me fascina e me impele a ser cada dia mais destemida. Obrigada pela vida, pela educação e por tudo que me proporcionaram.

Ao **Jaime**, meu amado irmão. Companheiro de vida que, apesar de ser o caçula, me ensina todos os dias sobre educação, política, literatura, a ser, enfim, uma pessoa melhor. Obrigada por seu olhar tão amoroso que me mostra o quanto que cresci ao longo destes quatro anos. Seu bom humor, sagacidade e gentileza fazem meus dias mais felizes.

Ao meu querido avô, **Ernesto Soares de Mello**. Sempre presente em minha vida, em meu coração. Meu exemplo maior de simplicidade, alegria e bondade. Se estou hoje conseguindo este título acadêmico, foi também por seu mérito: sua visão e coragem me fizeram chegar até aqui e hoje estamos colhendo. Saudades dos momentos em que ficávamos no alpendre da casa do sítio; o senhor lendo a Bíblia e rezando o terço e eu, criança, admirando aquele senhor tão sorridente e tão sábio.

À minha querida avô, **Maria Emilia**. Orgulho-me de carregar um dos seus nomes. Mulher forte e decidida, mas não menos amorosa. Obrigada por me propiciar a melhor infância que pude ter: no sítio, comendo cajá, procurando lagartas encantadas e escutando suas histórias. Obrigada pelos cortes de cabelo, pelos cães que a senhora me dava e cuidada, por todo o seu amor. Saudades.

À minha família, aos tios, tias, primos e primas. Em especial a **Francisca Soares**, minha querida tia. Por suas orações e cuidado, desde minha tenra idade; a **Lucas Emanuel**, primo querido que, este ano, adentra no mundo acadêmico e por quem tenho orgulho imenso; a **Tobias Queiroz**, primo que sempre torceu por minha jornada acadêmica e a **Airon Amaral**, primo tão prestativo e companheiro!

À professora **Keila Aparecida Moreira** pela orientação, colaboração e por todo o conhecimento transmitido durante a minha formação e crescimento profissional.

Ao professor **Marcelo Mendonça** e à querida **Ana Erundina** por me disponibilizarem seu tempo e as bactérias ATCC utilizadas neste estudo. À **Girliane Regina da Silva**, sempre disponível nas dificuldades com o HPLC. À **Amanda Reges** e **João Tiago Oliveira**, que com muito carinho e presteza ajudaram-me nas análises estatísticas. À **Alane Aquino** e **Renato dos Santos**, que me ajudaram com o bioensaio realizado neste estudo. À professora **Cristina de Souza-Motta**, por ter disponibilizado o micro-organismo e as micotoxinas utilizadas nesta pesquisa. Obrigada por compartilharem seus talentos comigo.

Ao **Centro Tecnológico de Laticínios – Instituto de Laticínios do Agreste (CT LATICÍNIOS – ILA)**, do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP), nas pessoas de **Vânia Lemos** e **Elizabel Oliveira**, que disponibilizaram a infraestrutura e a ajuda necessária para a elaboração dos queijos produzidos no estudo.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biociência Animal** pela oportunidade de estudo e aprimoramento profissional. Aos professores e funcionários, em especial ao professor **Rinaldo Mota**, sempre muito solícito, e à **Edna Cherias**, muito prestativa em minhas dúvidas, trazendo soluções importantes.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)** pela bolsa de estudos concedida, por meio do processo IBPG-1413-5.07/13. Ao **Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG)**, por disponibilizar sua infraestrutura, equipamentos e funcionários para o desenvolvimento do estudo. Em especial, agradeço a **Seu Cláudio, Seu Jair, Dona Neide** e **Camila Barros**, pelo carinho e amizade.

Aos professores com quem tive o prazer de compartilhar esta jornada: **Daniele Ribeiro, Elizabete Rodrigues, Horasa Andrade, Milene Santana** e **Renato Molica**. Cada um, ao seu modo, me ajudaram frente às mais diversas situações. Possuem qualidades incríveis! Espero um dia me tornar uma professora tão admirável quanto vocês.

Aos incríveis amigos que conquistei durante o doutorado, no **Setor de Biotecnologia**: **Adriano Moura, Allan Henrique, Anderson França, Elizane Melo, Jônatas Carvalho, José**

**Alexandre, Maiara Tábatha, Marcelle Moraes, Marcos Fellipe, Matheus Gouveia, Mauro Vilar, Osmar Soares, Rennan Lopes, Rodrigo Lira, Thiago Izaquiel e William Xavier.**

Aos amigos das jornadas acadêmicas, com quem dividi e divido as bancadas, os aperreios e os sonhos. Pessoas que me ajudaram e ajudam e por quem tenho imenso carinho: **Anna Carolina, Aline Julião, Camilla Lira, Edson Flávio, Gilvannya Sobral, Joyce Barros, Melry Medeiros, Natália Oliveira, Neide Cavalcante, Pablo Leal e Wellington Leal.** Sou extremamente sortuda por tê-los.

Aos queridos e preciosos amigos que fizeram a caminhada em busca do título acadêmico mais leve. Aqueles que não pegaram nos tubos de ensaio, mas que participaram ativamente desta fase. Sou privilegiada por tê-los como companheiros e companheiras de vida: **Diego Moraes, Dyanne Oliveira, Gizeli Panhosatto, Hans Lincoln, Laís Milena, Matheus Araújo, Osires Lustosa, Paulo Roberto e Raíssa Alexandre.**

Àqueles amigos com quem não tive oportunidade de estar sempre, seja pela distância ou pelo dia a dia corrido, mas que agradeço a paciência e amor e por não desistirem da minha amizade: **Amância Patriota, Deivid Lima, Elizabeth Sobral, Heloísa Fernanda, Jaqueline Capitó, Katarina Juliana, Mariana Sánchez e Sheylla Araújo.**

Aos preciosos achados destes quatro anos de doutorado: **André Lima, Lúcia Lima, Raquel Barros, Rafael Otaviano, Stephany Lins e Uemeson José.** Vocês apareceram no momento certo e me ofereceram a amizade de vocês sem pedir nada em troca.

À família **Menezes Ladislau da Silva**, por sempre me acolherem em seu lar quando precisei estar na capital pernambucana. A vocês, **Seu Sérgio, Dona Márcia, Camila, Mariana e Yaná**, todo o meu amor! Em especial, à minha grande amiga, minha querida irmã, **Mariana Ladislau.** Sempre presente em todos os momentos. Agradeço a Deus por sua vida.

Àqueles que quiseram tornar a jornada mais árdua — os mestres disfarçados de **pessoas difíceis** —, que passaram por estes quatro anos. Obrigada por me tornarem mais resiliente, motivada e forte...

*Obrigada!*

“(...) achava estudo a coisa mais fina do mundo. Não é. A coisa mais fina do mundo é o sentimento.”

*Adélia Prado*

## RESUMO

Com o aumento no debate público acerca de questões contemporâneas como o envelhecimento da população e as doenças relacionadas aos estilos de vida adotados pelas pessoas, têm-se cada vez mais despertado o interesse geral sobre a alimentação e seus efeitos sob a saúde humana. Um dos produtos alimentícios que pode atuar prevenindo e reduzindo algumas patologias é o queijo, que apresenta peptídeos bioativos capazes de modular uma série de reações em um organismo animal. Diante disso, foi objetivo desse estudo obter e aplicar enzimas coagulantes de leite de *Aspergillus tamaritii* URM6599 e de origem comercial na elaboração de queijos caprinos Minas Frescal e avaliar as atividades biológicas de seus peptídeos. Para tanto, foi necessário produzir e otimizar a produção de enzimas coagulantes por meio dos planejamentos estatísticos fatorial completo  $2^3$  e delineamento composto central; avaliar a produção de aflatoxinas (B1, G1, B2 e G2) pelo micro-organismo e a toxicidade do extrato enzimático por meio de bioensaio com *Artemia salina* e caracterizar o extrato enzimático obtido quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e ao pH, a NaCl e CaCl<sub>2</sub> e aos efeitos de íons e inibidores na atividade coagulante. Após obtenção e análise do extrato enzimático, os queijos foram produzidos e seus peptídeos extraídos para avaliação das atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas. A partir dos planejamentos estatísticos, a produção enzimática foi otimizada para uma atividade de 289,16 U.mL<sup>-1</sup>; o micro-organismo não produziu aflatoxinas em nenhum dos testes realizados e a DL50 dos náuplios de *A. salina* foi de 683 µg.mL<sup>-1</sup>, considerada de baixa toxicidade. As enzimas apresentaram atuação ótima aos 70 °C e pH em 5,5; atividade acima dos 50% em temperaturas abaixo de 60 °C e atividade acima dos 60% em valores de pH ácidos e alcalinos, por 1 hora. As enzimas foram inibidas por PMSF e pepstatina A, sugerindo a existência de serino e aspártico proteases no extrato bruto. As enzimas também foram tolerantes a íons metálicos, NaCl e CaCl<sub>2</sub>. Os peptídeos de ambos os queijos apresentaram atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas. Diante do exposto, observa-se que as enzimas coagulantes produzidas no estudo demonstram potencial de uso na elaboração de queijo Minas Frescal caprino funcional. Ademais, os resultados demonstram que o queijo tipo Minas Frescal produzido com leite caprino é uma excelente fonte de peptídeos bioativos.

**Palavras-chave:** antimicrobiano, antioxidante, anti-hipertensiva, Minas Frescal, peptídeos bioativos, proteases

## ABSTRACT

With the increase in public debate on contemporary issues such as population aging and people-related illnesses, the general interest in food and its effects on human health has been increasingly aroused. One of the food products that can act to prevent and reduce some pathologies is the cheese, which presents bioactive peptides capable of modulating a series of reactions in an animal organism. Therefore, it was the objective of this study to obtain and apply *Aspergillus tamaritii* URM6599 milk coagulant enzymes and commercial origin in the preparation of Minas Frescal goat cheeses and to evaluate the biological activities of their peptides. For that, it was necessary to produce and optimize the production of coagulant enzymes by means of the factorial statistical plans  $2^3$  complete and central composite design; to evaluate the production of aflatoxins (B1, G1, B2 and G2) by the microorganism and the toxicity of the enzymatic extract by means of bioassay with *Artemia salina* and to characterize the obtained enzymatic extract for the optimum pH and temperature, thermal stability and pH, NaCl and CaCl<sub>2</sub> and to the effects of ions and inhibitors on coagulant activity. After obtaining and analyzing the enzymatic extract, the cheeses were produced and their peptides extracted for evaluation of antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activities. From the statistical planning, the enzymatic production was optimized for an activity of 289.16 U.mL<sup>-1</sup>; the microorganism did not produce aflatoxins in any of the tests carried out and the LD50 of the *A. salina* nauplii was 683 µg.mL<sup>-1</sup>, considered of low toxicity. The enzymes presented optimum performance at 70 °C and pH at 5.5; activity above 50% at temperatures below 60 °C and activity above 60% at acid and alkaline pH values for 1 hour. The enzymes were inhibited by PMSF and pepstatin A, suggesting the existence of serine and aspartic proteases in the crude extract. The enzymes were also tolerant to metal ions, NaCl and CaCl<sub>2</sub>. The peptides of both cheeses presented antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activities. In view of the above, it is observed that the coagulant enzymes produced in the study demonstrate potential use in the elaboration of Minas coolcal goat cheese. In addition, the results demonstrate that Minas Frescal type cheese produced with goat milk is an excellent source of bioactive peptides.

**Key words:** antimicrobial, antioxidant, antihypertensive, Minas Frescal, bioactive peptides, proteases

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1 Alimentos funcionais .....	19
2.2 Leite .....	20
2.3 Leite caprino .....	23
2.4 Queijos .....	25
2.5 Queijo Minas Frescal .....	28
2.6 Proteases coagulantes de leite de origem microbiana .....	30
2.7 Peptídeos bioativos .....	32
2.7.1 Peptídeos antioxidantes .....	33
2.7.2 Peptídeos anti-hipertensivos .....	35
2.7.3 Peptídeos antimicrobianos .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	40
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
3.2.1 Capítulo I .....	40
3.2.2 Capítulo II .....	40
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	41
<b>CAPÍTULO I</b> .....	50
Novas enzimas de origem fúngica com ação coagulante de leite: otimização da produção, caracterização e avaliação de toxicidade do extrato enzimático de <i>Aspergillus tamarii</i> URM6599 .....	50
<b>RESUMO</b> .....	52
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	53
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
2.1 Micro-organismo, reativação, meio de manutenção e preparação do inóculo .....	54
2.2 Avaliação da produção de micotoxinas por <i>A. tamarii</i> URM6599 em meio Ágar Coco ...	55
2.3 Avaliação da produção de micotoxinas por <i>A. tamarii</i> URM6599 por teste de vapor de amônio .....	55
2.4 Avaliação da presença de micotoxinas no extrato enzimático bruto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	56

2.5 Determinação da toxicidade do extrato enzimático bruto por bioensaio com <i>Artemia salina</i> .....	57
2.6 Produção das enzimas coagulantes do leite.....	57
2.6.1 Fermentação submersa e avaliação dos componentes na produção enzimática.....	57
2.6.2 Otimização da produção enzimática através de delineamento composto central ....	58
2.6.3 Validação do modelo estatístico.....	58
2.7 Atividade coagulante do leite .....	59
2.8 Efeitos da temperatura e do pH na atividade coagulante do extrato enzimático e na estabilidade enzimática.....	59
2.9 Efeitos da concentração de CaCl <sub>2</sub> e NaCl na atividade coagulante do extrato enzimático	60
2.10 Efeitos de inibidores de proteases e íons sobre a atividade coagulante do leite.....	60
2.11 Análises estatísticas .....	61
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	61
3.1 Avaliação da produção de micotoxinas por <i>A. tamaritii</i> URM6599 .....	61
3.2 Detecção de aflatoxinas por <i>A. tamaritii</i> URM6599 em extrato enzimático bruto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	63
3.3 Determinação da toxicidade do extrato enzimático bruto por bioensaio com <i>Artemia salina</i> .....	64
3.4 Produção e otimização de proteases coagulantes de leite de <i>A. tamaritii</i> URM6599 .....	65
3.5 Efeitos da temperatura e do pH na atividade coagulante do extrato enzimático e na estabilidade enzimática.....	69
3.6 Efeitos da concentração de CaCl <sub>2</sub> e NaCl na atividade coagulante do extrato enzimático	71
3.7 Efeitos de inibidores de proteases e íons sob a atividade coagulante do extrato enzimático.....	72
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	73
<b>5. AGRADECIMENTOS</b> .....	74
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>TABELAS</b> .....	78
<b>FIGURAS</b> .....	87
<b>CAPÍTULO II</b> .....	93
Propriedades bioativas de peptídeos de queijos Minas Frescal caprinos produzidos com enzimas coagulantes de leite de <i>Aspergillus tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial: um estudo comparativo .....	93

<b>RESUMO</b> .....	95
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	95
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	97
2.1 Obtenção e preparo do extrato enzimático de <i>Aspergillus tamaritii</i> URM6599 para produção de queijo .....	97
2.2 Produção dos queijos Minas Frescal .....	98
2.3 Determinação do rendimento bruto dos queijos .....	99
2.4 Extração dos peptídeos dos queijos .....	99
2.5 Ultrafiltração e preparação dos peptídeos para ensaios <i>in vitro</i> .....	99
2.6 Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....	100
2.6.1 Atividade de sequestro do radical ABTS <sup>+</sup> .....	100
2.6.2 Atividade de sequestro do radical DPPH <sup>•</sup> .....	101
2.6.3 Atividade de sequestro do radical hidroxila (OH <sup>•</sup> ).....	101
2.6.4 Atividade de sequestro do radical ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	102
2.6.5 Atividade quelante de cobre (Cu <sup>2+</sup> ).....	103
2.6.6 Atividade quelante de ferro (Fe <sup>2+</sup> ) .....	104
2.6.7 Atividade anti-hipertensiva .....	104
2.6.8 Atividade antimicrobiana .....	105
2.7 Análises estatísticas .....	106
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	106
3.1 Rendimento bruto dos queijos .....	106
3.2 Atividade antioxidante dos peptídeos dos queijos.....	107
3.2.1 Captura do radical ABTS <sup>+</sup> .....	108
3.2.2 Captura do radical DPPH <sup>•</sup> .....	110
3.2.3 Inibição da formação dos radicais OH <sup>•</sup> e O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	111
3.2.4 Atividades quelantes de cobre e ferro .....	113
3.3 Atividade anti-hipertensiva dos peptídeos dos queijos .....	115
3.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos dos queijos .....	117
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	120
<b>5. AGRADECIMENTOS</b> .....	120
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	121
<b>TABELAS</b> .....	127
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	135

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1.</b> Etapas básicas de fabricação de queijo coagulado enzimaticamente.....	25
<b>Figura 2.</b> Exemplar de queijo Minas Frescal.....	28
<b>Figura 3.</b> Esquema da geração de peptídeos bioativos derivados das proteínas do leite.....	32
<b>Figura 4.</b> Diferentes modelos de ação de peptídeos antimicrobianos: A – Modelo <i>barrel stave</i> ; B – Modelo <i>carpet</i> ; e C – Modelo <i>toroidal</i> . A porção vermelha do peptídeo representa a superfície hidrolítica, enquanto a porção azul a hidrofóbica.....	37

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Teste de detecção da produção de aflatoxinas de <i>A. tamaraii</i> URM6599. Meio Ágar Coco sob luz ultravioleta a 365 nm (A); Teste de vapor amônio em Meio Extrato de Levedura (B) e Meio Ágar Coco (C) após sete dias de incubação.....	87
<b>Figura 2.</b> Detecção de aflatoxinas AFB1 (cor rosa), AFB2 (cor marrom), AFG1 (cor azul claro) e AFG2 (cor azul escuro) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato enzimático bruto de <i>A. tamaraii</i> URM6599 (cor preta).....	88
<b>Figura 3.</b> Bioensaio com <i>Artemia salina</i> para determinação do efeito citotóxico do extrato bruto enzimático produzido por <i>A. tamaraii</i> URM6599.....	89
<b>Figura 4.</b> Superfície de resposta da produção de proteases coagulantes de leite por <i>A. tamaraii</i> URM6599 demonstrando a interação entre as variáveis NH <sub>4</sub> Cl e glicose....	90
<b>Figura 5.</b> Propriedades físico-químicas de coagulação do leite das proteases produzidas por <i>A. tamaraii</i> URM6599. Atividade ótima (•) e estabilidade (▪) a temperatura (A) e ao pH (B).....	91
<b>Figura 6.</b> Efeito da concentração de CaCl <sub>2</sub> (•) e NaCl (▪) na coagulação do leite pelas proteases produzidas por <i>A. tamaraii</i> URM6599.....	92

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Composição (%) comparativa do leite de diferentes espécies biológicas.....	<b>20</b>
<b>Tabela 2.</b> Frações de caseína (%) nos leites bovino e caprino.....	<b>21</b>

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial completo $2^3$ para produção de proteases coagulantes de leite por <i>A. tamaritii</i> URM6599.....	<b>78</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores codificados e reais utilizados no delineamento central composto para produção de proteases coagulantes de leite por <i>A. tamaritii</i> URM6599.....	<b>79</b>
<b>Tabela 3.</b> Matriz correspondente do planejamento fatorial $2^3$ com os resultados de atividade coagulante ( $U \cdot mL^{-1}$ ) do extrato enzimático bruto do <i>A. tamaritii</i> URM6599...	<b>80</b>
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância (ANOVA) para produção de proteases coagulante de leite por <i>A. tamaritii</i> URM6599 de acordo com o planejamento fatorial $2^3$ .....	<b>81</b>
<b>Tabela 5.</b> Estimativa dos efeitos das variáveis na produção de proteases coagulantes de leite por <i>A. tamaritii</i> URM6599 de acordo com o planejamento fatorial $2^3$ .....	<b>82</b>
<b>Tabela 6.</b> Matriz do delineamento composto central com os resultados de atividade coagulante ( $U \cdot mL^{-1}$ ) do extrato enzimático bruto produzido por <i>A. tamaritii</i> URM6599.	<b>83</b>
<b>Tabela 7.</b> Estimativa dos efeitos das variáveis na produção de proteases coagulantes de leite por <i>A. tamaritii</i> URM6599 de acordo com o delineamento composto central.....	<b>84</b>
<b>Tabela 8.</b> Análise de variância (ANOVA) para produção de proteases coagulante de leite por <i>A. tamaritii</i> URM6599 de acordo com o delineamento composto central.....	<b>85</b>
<b>Tabela 9.</b> Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade coagulante do extrato enzimático produzido por <i>Aspergillus tamaritii</i> URM6599.....	<b>86</b>

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Atividade de captura do radical ABTS <sup>•+</sup> (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial.....	<b>127</b>
<b>Tabela 2.</b> Atividade de captura do radical DPPH <sup>•</sup> (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial..	<b>128</b>
<b>Tabela 3.</b> Atividade de captura do radical OH <sup>•</sup> (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial..	<b>129</b>

<b>Tabela 4.</b> Atividade de captura do radical $O_2^-$ (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial..	<b>130</b>
<b>Tabela 5.</b> Atividade quelante de ferro (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial.....	<b>131</b>
<b>Tabela 6.</b> Atividade quelante de cobre (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial.....	<b>132</b>
<b>Tabela 7.</b> Atividade anti-hipertensiva (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial.....	<b>133</b>
<b>Tabela 8.</b> Atividade antimicrobiana (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de <i>A. tamaritii</i> URM6599 e de fonte comercial.....	<b>134</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O consenso geral sobre o impacto do estilo de vida na saúde considera que a dieta representa um fator crucial na promoção da saúde. É por meio dos alimentos que organismos obtêm os nutrientes necessários para desenvolver sua imunidade, que auxilia na prevenção, controle e cura de doenças e desordens metabólicas.

Além do papel nutricional, vários alimentos desempenham efeitos biológicos benéficos em organismos que os ingerem e a estes é dado o nome de alimentos funcionais. Na composição destes alimentos são encontradas substâncias bioativas capazes de atuar na modulação de processos fisiológicos, que facilitam a manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, na proteção das células frente a substâncias oxidantes, no equilíbrio do microbiota intestinal, na redução de colesterol, entre outros.

Um exemplo de alimento funcional é o queijo, um produto lácteo bastante apreciado por vários consumidores não só devido à incomum complexidade e variedade de seus atributos sensoriais, mas também devido ao seu excepcional valor nutricional. Constitui uma importante fonte dietética de vários nutrientes e compostos promotores de saúde, como proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, ácido linoleico conjugado, minerais, vitaminas, compostos polifenólicos e peptídeos bioativos.

Dentre os compostos citados, os peptídeos bioativos presentes nos queijos podem influenciar diretamente nas respostas fisiológicas de organismos e hoje em dia são explorados como ingredientes biologicamente ativos. Alguns estudos já foram realizados com o objetivo de conhecer as propriedades desses peptídeos em queijos de todo o mundo; como resultado, foram encontrados peptídeos com atividades antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana.

Por conhecer a importância dos alimentos funcionais na atualidade, bem como a necessidade de novas enzimas coagulantes de leite que possam promover incremento da atividade biológica de queijos, objetivou-se com o presente estudo aplicar enzimas coagulantes de leite de *Aspergillus tamaris* URM6599 e de origem comercial na obtenção de queijos caprinos Minas Frescal e avaliar as atividades biológicas de seus peptídeos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Alimentos funcionais**

A preocupação social acerca de temas relacionados à saúde tem crescido consideravelmente ao longo dos últimos anos. Um dos pontos relacionados a esse contexto, sobre o qual também é perceptível um aumento na preocupação da população, é a alimentação. Tem crescido o interesse das pessoas a respeito da importante relação existente entre a nutrição e a saúde. Esse cenário contribui para que seja atribuída grande importância à pesquisa relativa aos alimentos e ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios que correspondam à relação entre hábitos alimentares e saúde. Daí parte a significativa relevância dos chamados alimentos funcionais, que vêm sendo bastante estudados, oriunda justamente de seu grande potencial em questões como a prevenção de doenças e a melhoria da saúde (REIS et al., 2017).

O conceito de alimentos funcionais remonta ao Japão nos anos 80, quando o Ministério da Saúde e do Bem-Estar do país criou um sistema regulatório para alimentos que produzissem benefícios à saúde. O objetivo do órgão japonês foi o de melhorar a saúde da população e controlar o constante aumento nos gastos públicos com essa que é, geralmente, uma fatia grande do orçamento dos governos. Desde então, diferentes países adotaram ideias também diferentes para definir os alimentos funcionais, de forma que não há uma definição universalmente aceita a respeito deles (KAUR; SINGH, 2017).

Apesar dessas diferenças, geralmente são considerados como pertencentes à categoria dos alimentos funcionais àqueles que incluem uma variedade de componentes benéficos para a saúde humana, que vão além dos efeitos da nutrição básica (KÜSTER-BOLUDA; VIDAL-CAPILLA, 2017).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define, na Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999, que alimento funcional é aquele que pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

Os alimentos funcionais são encontrados em todas as categorias de alimentos, incluindo, por exemplo: produtos naturais, que são os componentes salutareos presentes em frutas e vegetais; produtos alterados, que são grãos integrais e fibras em pães e cereais e o cálcio no leite; produtos fortificados, como o leite fortificado com vitamina D e sucos de fruta fortificados com vitamina C; produtos enriquecidos, a exemplo da margarina adicionada de

prebióticos e probióticos; e as *commodities* melhoradas, como ovos com conteúdo de ômega-3 aumentado, produzidos pela alteração da dieta das galinhas (KAUR; SINGH, 2017).

O leite é um dos alimentos que figuram no conjunto daqueles que têm sido estudados enquanto alimentos funcionais e utilizados na fabricação de novos produtos dessa categoria, como o queijo. Além de serem alimentos conhecidos por representarem fontes alimentícias ricas em nutrientes essenciais como proteínas, vitaminas e minerais, os componentes desses dois alimentos têm demonstrado exercer efeitos importantes na saúde, o que contribui de maneira definitiva para que sejam considerados alimentos biologicamente ativos (LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2017).

## 2.2 Leite

O leite é um líquido secretado por fêmeas mamíferas, das quais existem cerca de 4.500 espécies em todo o mundo. É produzido para atender as necessidades nutricionais dos neonatos, como energia, aminoácidos essenciais e grupos aminos para a biossíntese dos não-essenciais, ácidos graxos, vitaminas, elementos inorgânicos e outros fatores nutricionais, como taurina e água (O'MAHONY; FOX, 2013).

É uma bebida amplamente disseminada em todo o mundo e participa da dieta de milhões de indivíduos, fornecendo macro e micronutrientes importantes para a promoção do desenvolvimento e manutenção dos sistemas neurológico, muscular e esquelético. Além disso, é considerado também o alimento mais completo e de elevado valor biológico para alimentação humana (VISIOLI, 2016).

O leite é definido como o produto obtido da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (CORASSIN et al., 2016); quando obtido de outros animais, deve-se denominá-lo segundo a espécie de que proceda, ou seja: quando de origem caprina, deve-se nomear como “leite de cabra” (BRASIL, 2017).

Em sua composição, adicionalmente alguns constituintes do leite apresentam outras funções fisiológicas para além da nutrição, como sistemas antimicrobianos (imunoglobulinas, lactoperoxidase, lactoferrina), enzimas e inibidores enzimáticos, proteínas transportadoras de vitaminas e fatores de crescimento e de controle celular; entretanto, como os requerimentos nutricionais e fisiológicos de cada espécie são únicos, a composição do leite mostra diferenças interespecíficas marcantes (FOX et al., 2017a), como pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição (%) comparativa do leite de diferentes espécies biológicas.

<b>Espécie</b>	<b>Sólido Total</b>	<b>Gordura</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lactose</b>	<b>Cinzas</b>
<i>Homo sapiens</i>	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
<i>Bos taurus</i>	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
<i>Bos indicus</i>	16,3	6,7	4,7	4,8	0,8
<i>Capra hircus</i>	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
<i>Ovis aries</i>	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0

Fonte: Adaptada de FOX et al. (2017a)

Do ponto de vista tecnológico, as proteínas, lipídios, lactose, cálcio, fosfato e o pH são os componentes e características mais importantes do leite para a produção de seus derivados. As proteínas do leite podem ser divididas em duas categorias principais: caseínas e proteínas do soro. As caseínas são as proteínas dominantes e estão presentes no leite sob a forma de micelas de caseína; já as proteínas do soro são subprodutos do processo da fabricação do queijo e amplamente utilizadas pela indústria na formulação de alimentos (MOHAMMADIAN et al., 2017).

As caseínas são consideradas o principal componente proteico do leite, entretanto seu conteúdo pode variar, dependendo da espécie, da raça, do período de lactação e estação. São as únicas fosfoproteínas que estão em suspensão no leite como partículas coloidais. As principais caseínas existem em forte associação com elas mesmas e entre si na forma de partículas coloidais, de forma esférica, com diâmetro variando de 50 a 600 nm, com média aproximada de 150 nm, conhecidas como "micelas de caseína" (FOX; BRODKORB, 2008).

Uma típica micela de caseína é constituída por mais de 20.000 moléculas de proteínas individuais. No caso de leite bovino, há quatro diferentes frações de caseína,  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, em uma concentração de 4:1:3,5:1,5, respectivamente (DALGLEISH, 2011).

Essas frações diferem em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias e possuem diferenças nas massas moleculares. Apresentam ainda diferente conteúdo de aminoácidos; um exemplo é que somente as frações  $\alpha_{s2}$ -caseína e  $\kappa$ -caseína contêm cisteína. Este resíduo forma pontes de dissulfeto intermoleculares e a ausência dele, como observado nas frações  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ , permite uma maior flexibilidade nessas moléculas. As caseínas, especialmente a  $\beta$ -caseína, são

proteínas de cadeias abertas e com predominância de estruturas primárias o que se deve, em parte, ao conteúdo de prolina distribuída na cadeia polipeptídica, que previne a formação de estruturas secundárias (DICKINSON, 1999).

Em outras espécies, nem todos os tipos de caseína estão presentes. O leite humano, por exemplo, contém cerca de 30 a 50% de caseína, dependendo do estágio da lactação, sendo predominantemente a  $\beta$ -caseína, com pouca ou nenhuma  $\alpha_s$ -caseína (DALGLEISH, 2011). Dessa forma é possível inferir que as diferentes caseínas não são absolutas e nem preservadas entre as espécies. Ademais, dentro de cada grupo de caseínas aparecem variantes genéticas, de acordo com a espécie e raça animal (SGARBIERI, 2005).

Outro exemplo interessante são as características inerentes às caseínas do leite bovino e caprino. O leite caprino apresenta aproximadamente as mesmas caseínas presentes no bovino, entretanto diferem em alguns aspectos. As micelas de caseína no leite bovino são pequenas (60 a 80 nm) quando comparadas com as do leite caprino, que variam entre 100 e 200 nm (ZERVAS; TSIPLAKOU, 2013). Existem também diferenças no conteúdo das principais frações de caseína em leite de cabra e vaca, que estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Frações de caseína (%) nos leites bovino e caprino.

Fração	Leite caprino	Leite bovino
$\alpha_s$ -caseína	26	56
$\beta$ -caseína	64	33
$\kappa$ -caseína	10	11
$\alpha_s$ -caseína/ $\beta$ -caseína	0,41	1,70

Fonte: Adaptada de Zervas e Tsiplakou (2013).

O leite de cabra possui níveis acentuadamente diferentes de  $\alpha_{s1}$ -caseína e  $\alpha_{s2}$ -caseína daquelas encontradas no leite de vaca. O leite caprino apresenta conteúdo muito menor (ou nenhum) de  $\alpha_{s1}$ -caseína e maior  $\alpha_{s2}$ -caseína do que o leite bovino, que pode ter nenhum. Na Tabela 2 também é possível perceber que a  $\beta$ -caseína é a principal fração das caseínas totais no leite caprino, enquanto a  $\alpha_{s1}$ -caseína é a principal caseína no leite bovino (ZERVAS; TSIPLAKOU, 2013).

### 2.3 Leite caprino

As cabras foram as primeiras espécies a serem domesticadas em criações racionais, a cerca de 8000 a.C. na Mesopotâmia, parte do Oriente Médio de hoje. Durante séculos, os humanos usaram as cabras para muitos fins em todos os continentes, no entanto, a tendência mundial é que a caprinocultura leiteira não é tão encorajada e/ou reconhecida, principalmente quando comparada com outros setores de produção animal, especialmente a bovinocultura leiteira (ZERVAS; TSIPLAKOU, 2011).

Há muitas razões para que esta tendência ocorra, algumas delas é que apesar dos caprinos serem os principais fornecedores de produtos lácteos e de carne para a população rural, seus rebanhos são subestimados porque a maioria das criações não são oficialmente contabilizadas pelos órgãos governamentais; outra é que em muitos países, o leite caprino tem que concorrer com a alta produtividade do leite de vaca, e em outros com a diversidade de produtos (lã, carne, leite) e leite com alto conteúdo de sólidos para a produção de queijos das ovelhas; além disso, os produtos lácteos caprinos também concorrem em um mercado específico, em que produtos similares advindos de bovinos e ovinos são mais baratos (SLAČANAC et al., 2010).

Todavia, em algumas áreas, pequenos ruminantes são valorizados por seus produtos específicos e são mantidos mesmo quando a criação de gado é possível ou praticada. Exemplos desse tipo de criação podem ser encontrados na França, Itália, Espanha, Portugal e alguns outros países europeus e mediterrâneos, onde o leite para processamento de queijos é produzido por ovelhas e cabras, às vezes em sistemas intensivos. Também na Ásia, onde o leite e produtos lácteos obtidos de ovinos e caprinos são preferidos aos de outros animais e em países islâmicos, onde cordeiros e cabritos desempenham papel importante em feriados e festas religiosas (GALL, 2013).

A produção mundial de leite caprino em 2016 foi de 2,39%, contudo tem aumentado consideravelmente (FAO, 2016). Um dos fatores decisivos no crescimento do consumo de leite caprino e de seus produtos são os seus efeitos benéficos percebidos na saúde humana, plenamente reconhecidos pela comunidade científica. Além disso, possuem odores e sabores aceitáveis e atrativos e podem ser consumidos como alternativa ao leite bovino e seus produtos, pois são menos alergênicos e possuem maior digestibilidade. Os produtos advindos do leite caprino ainda podem ser utilizados na dieta de crianças e idosos (JANDAL et al., 1996; PARK et al., 2007; AMIGO; FONTECHA, 2011).

Na alimentação de crianças, o leite de cabra se caracteriza em um excelente alimento, sendo recomendado como substituto ideal do leite humano quando não há a possibilidade de amamentação. É o leite que mais se aproxima do leite humano, em termos de aminoácidos sulfurosos, como metionina e cisteína; além disso, tanto o leite humano, quanto caprino, são ricos em lisina, que é um aminoácido de grande importância na alimentação infantil. Ademais, é um leite muito apreciado por pessoas que apresentam alergia ao leite da vaca e outras enfermidades gastrointestinais (QUADROS, 2007; GOBBA et al., 2014; ZEBENE et al., 2014).

Tem sido considerado também alimento fundamental na dieta de indivíduos por apresentar-se como fonte de sais minerais, vitaminas, proteínas e ácidos graxos (SILANIKOVE et al., 2010). A porcentagem de gordura total nos leites de cabra e vaca são bastantes semelhantes, embora duas características da gordura de leite de cabra têm consequências importantes para fabricação de produtos. Uma é o menor tamanho dos glóbulos de gordura em comparação às do leite de vaca. Em ambas as espécies os glóbulos variam de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Porém o número de glóbulos com diâmetro menor que 5  $\mu\text{m}$  é aproximadamente de 60% no leite da vaca, em contraste com aproximadamente 80% no leite de cabra. Essa diferença resulta em textura mais suave nos produtos derivados do leite caprino. A segunda característica é a composição de ácidos graxos, com maior proporção de ácidos graxos de cadeia média, por exemplo o caprónico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0), que são parcialmente responsáveis pelo odor característico de leite de cabra (SILANIKOVE et al., 2010).

A lactose é o principal carboidrato presente tanto no leite bovino quanto no caprino; contudo, o teor de lactose é ligeiramente menor do que aquele observado no leite de vacas, apresentando 4,1% frente a 4,8% destes últimos (SILANIKOVE et al., 2010; FOX et al., 2017a). Em relação aos minerais, o leite caprino apresenta cerca de 0,70 a 0,85% e concentrações maiores de cálcio, fósforo e potássio, quando comparado ao leite bovino; quanto às vitaminas, o leite de cabra apresenta maior teor de vitamina A, já que cabras conseguem converter o  $\beta$ -caroteno dos alimentos em vitamina A (SLAČANAC et al., 2010).

Diante deste cenário, é possível ressaltar que o leite caprino se apresenta como matéria-prima aos mais variados produtos; industrialmente, há a possibilidade de aplicação de variadas operações tecnológicas para a obtenção de derivados lácteos com diferentes características sensoriais, nutricionais e, mais recentemente, de promoção de saúde. É considerado ainda importante fonte de proteínas e sua demanda está associada à produção de iogurtes e queijos, principalmente (ROHENKOHL et al., 2011; PEREIRA et al., 2016).

## 2.4 Queijos

Queijo é o nome genérico de um grupo de produtos à base de leite fermentados, produzidos em todo o mundo em uma grande diversidade de aromas, texturas e formas. Acredita-se que o queijo surgiu no “Crescente Fértil”, entre os rios Eufrates e Tigre, no Iraque, há cerca de 8.000 anos, durante a chamada “Revolução Agrícola”. Assim que as primeiras espécies de mamíferos foram domesticadas, o valor nutritivo do leite e outros produtos lácteos foi reconhecido e se tornaram componentes importantes na dieta humana (FOX et al., 2017b).

Na teoria mais provável do seu surgimento, há o relato de que pastores observaram que o leite acidificava e era separado em massa e soro e, sendo a massa moldada e mais seca, resultava em um tipo de alimento de fácil obtenção. Também naquela época, foi observado que a coalhada ácida gerava estabilidade no produto durante o armazenamento e que, quando desidratada e salgada, essa estabilidade aumentava consideravelmente (PAULA et al., 2009). Em outra teoria, antes da utilização da cerâmica, o queijo teria sido descoberto pela utilização de bolsas feitas de peles ou estômagos de animais para estocagem do leite, fato muito comum à época e que permanece em alguns países até os dias atuais. Ao ser estocado em tal recipiente, o leite entraria em contato com enzimas coagulantes do tecido animal e se coagularia durante a estocagem, liberando o soro (FOX, 1993).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o queijo:

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

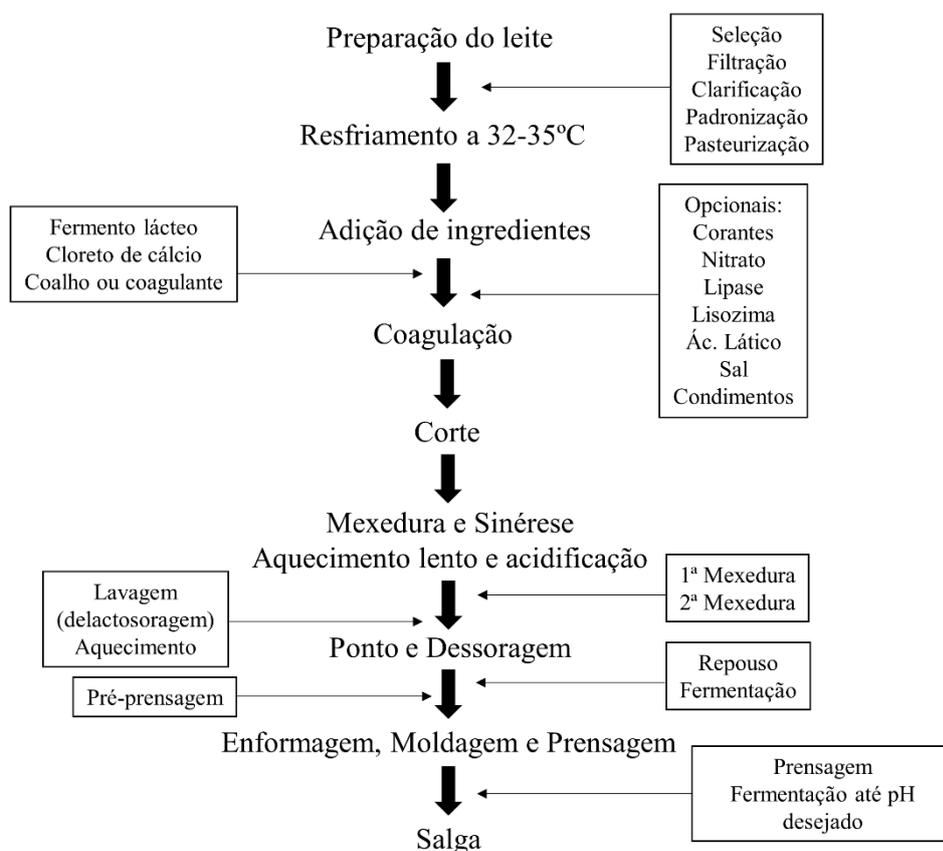
Essencialmente, o queijo é um produto de umidade variável, com longa vida útil, quando comparado ao leite. O processo de fabricação do queijo promove desidratação parcial do leite que, juntamente com a adição de sal e diminuição do pH, confere um efeito conservador e seguro para o consumo. É considerado um alimento lácteo de alta densidade nutricional que fornece aos consumidores uma grande variedade de texturas, aromas e sabores. Essa variedade

é essencialmente resultado das origens históricas, geográficas e ambientais de cada tipo de queijo. São distintos, por exemplo, quanto ao tipo de leite utilizado, que pode derivar de vários mamíferos; dos diferentes ingredientes, dos procedimentos do processamento e das condições de maturação utilizados em sua fabricação (CHANDAN; KAPOOR, 2011a).

Queijos e seus produtos derivados são consumidos como tal ou são utilizados como ingredientes em entradas, pratos principais e como lanches prontos. Os produtos derivados de queijo são projetados para serem consumidos como fatias em sanduíches ou como molhos e cremes que podem servir de cobertura para vegetais ou bolachas (CHANDAN, 2011).

A elaboração de um queijo é um processo bastante simples, mas envolve fenômenos químicos e físicos complexos. É essencialmente um processo de concentração, procedendo com etapas de fabricação projetadas para controlar a química das moléculas de caseína (JOHNSON; LAW, 2010). A Figura 1 apresenta as etapas básicas de fabricação de queijo coagulado enzimaticamente.

**Figura 1.** Etapas básicas de fabricação de queijo coagulado enzimaticamente.



Fonte: Adaptado de Paula et al. (2009).

Várias etapas estão envolvidas na produção de queijos, as principais são: coagulação, acidificação, dessoramento dos grãos (sinérese), enformagem, prensagem, salga e maturação (PAULA et al., 2009). Essas etapas são comuns na elaboração da maior parte dos queijos pelo mundo e as diferenças dentro e entre as variedades de queijos são das modificações exercidas nestas etapas, resultando em distintas características, como aparência, textura e *flavour* (SANT'ANA, 2013).

Etapas fundamentais para o início do processamento de queijos é a preparação do leite, que no geral inclui os passos de seleção, padronização e tratamento térmico do mesmo. Processos como alta pressão e ultrafiltração também podem ser realizados, a depender do objetivo do produto final (CASTRO et al., 2015).

Após tratamento do leite, a coagulação é realizada, sendo o passo crucial na produção de queijo e etapa em que ocorre a hidrólise da principal proteína do leite, a caseína, resultando na formação da coalhada. É por meio desta etapa em que proteínas, gorduras e as frações minerais e vitamínicas consolidam-se na forma sólida (CHANDAN; KAPOOR, 2011b).

A coagulação pode ser realizada pela adição de enzimas proteolíticas, como a quimosina, ao leite. A ação coagulante da quimosina, em especial, é obtida pela hidrólise da ligação Fenilalanina<sub>105</sub>-Metionina<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, que transforma a caseína, anteriormente inserida em um sistema coloidal, em um agregado instável. Neste processo, parte da água juntamente com as proteínas do soro e parte do conteúdo de lactose são perdidos na sinérese, processo no qual o soro é expulso do gel de caseína (JANHØJ; QVIST, 2010).

A etapa de corte consiste em dividir o coágulo em partes iguais a fim de facilitar a expulsão do soro. Para queijos moles, o corte da coalhada é reduzido, obtendo-se blocos grandes. Quando se pretende elaborar um queijo mais duro, é necessário corte mais intenso, objetivando obter proporções menores, as quais condicionam uma maior intensidade de dessoramento. Em termos descritivos, fala-se de coalhada do tamanho de ladrilho, de noz, de grão-de-bico ou de arroz. Para que a sinérese ocorra de forma eficiente, realiza-se ainda agitação da coalhada cortada, mediante movimento contínuo do lactossoro (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

Após o dessoramento, a massa é então colocada em formas de tamanho e formato específicos, em um processo chamado de enformagem ou moldagem. Nesta etapa ocorre ainda dessoragem final do lactossoro presente entre os grãos da coalhada e a formação de uma massa contínua e homogênea. Queijos de alta umidade formam massa sem a necessidade de prensagem, enquanto aqueles de baixa umidade necessitam de pressão mecânica para que sejam

moldados. Os queijos podem ser moldados em formas que vão de 250 gramas até 80 quilos, a depender da variedade (FOX et al., 2015).

A salga por sua vez, é outra importante etapa na elaboração de queijos e possui como objetivos o controle do crescimento microbiano e das atividades enzimáticas, a promoção da sinérese e a modificação do *flavour*, textura e outras propriedades físicas. Esta etapa é realizada em todas as variedades de queijo em algum momento da fabricação, podendo-se utilizar três métodos: sal aplicado sobre a superfície do queijo, mistura do sal com a coalhada antes da dessoragem ou ainda imersão do queijo em salmoura (GUINEE, 2004; ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

A fase final da elaboração de queijos é a maturação, que ocorre durante determinado tempo, em definidas temperatura e umidade relativa. Algumas variedades são maturadas por períodos que vão de três semanas, como o Mozzarella, até dois anos, como o Parmesão. Geralmente, o período de maturação é inversamente proporcional ao teor de umidade do queijo. Todavia, muitos queijos são consumidos frescos, sem necessidade de maturação, a exemplo do queijo Minas Frescal (FOX et al., 2015).

## **2.5 Queijo Minas Frescal**

Em toda a América Latina, os queijos frescos são muito comuns. No México os tipos Panela e Doble Crema são exemplos, possuindo teor de umidade entre 50 e 55%. Na Colômbia, o queijo tipo Camposino representa o típico Frescal, apresentando teor de umidade entre 47 a 51% (BALLINGER, 2001).

Esses tipos de queijo são denominados também de queijos frescos, que podem ser elaborados a partir de leite de vaca, cabra, ovelha ou búfala, sejam pasteurizados, desnatados, semidesnatados ou adicionados de creme de leite, coagulados por coagulantes, fermentos lácteos ou ação mista. São queijos com sabor lácteo, suave, de elevada umidade, com formação ou sem formação de crosta fina e não maturados. São produtos também bastante perecíveis, com prazo de validade reduzido, podendo ser consumidos logo após o término de seu processamento (RODRIGUES, 2016). No Brasil, como exemplos de queijos frescos, têm-se os queijos Coalho e Minas Frescal.

O queijo tipo Minas Frescal é um dos queijos mais populares e importantes do Brasil devido ao elevado rendimento, baixo custo do produto final e simplicidade no processo de fabricação, que torna o produto atraente para a indústria de laticínios (BRIGIDO et al., 2004; ABIQ, 2017).

A fabricação do Minas Frescal foi iniciada no século XVIII, em regiões onde criações de gado leiteiro predominavam. A técnica foi introduzida por imigrantes dinamarqueses e holandeses na região sul de Minas Gerais e Serra da Mantiqueira, e posteriormente difundida para o território nacional. Com o passar dos anos, a tecnologia de fabricação dos queijos foi repassada de geração a geração e ainda é muito valorizada, principalmente em empreendimentos de agricultura familiar (VINHA et al., 2010).

De acordo com o MAPA, o queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, que pode ser complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas. É obtido na forma de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada. É ainda classificado como queijo semigordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, possuindo cor esbranquiçada e sabor suave a levemente ácido. Pode apresentar uma leve crosta fina e é comercializado na forma cilíndrica e com peso variando de 0,3 a 5 kg (BRASIL, 1996; 2004). A Figura 2 mostra um exemplar de um queijo Minas Frescal.

**Figura 2.** Exemplar de queijo Minas Frescal.



Fonte: Arquivo pessoal.

Comercialmente podemos encontrar queijos Minas Frescal de produção industrial e caseira, sendo considerado como caseiro aquele produzido sem maiores tecnologias e que geralmente é vendido sem rótulo (VISOTTO et al., 2011). Ambos os tipos de queijo apresentam grande variabilidade, em termos de padronização de consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento, principalmente os advindos de produção caseira. Isso ocorre devido à adoção de diferentes técnicas de fabricação empregadas em todo o Brasil (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Apesar do queijo Minas Frescal ser comumente elaborado com leite de vaca, pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveram um queijo Minas Frescal com leite de cabra com sucesso (EGITO et al., 2009). Na elaboração deste produto foi utilizada enzima coagulante de leite comercial, entretanto sabe-se que outras enzimas advindas de micro-organismos podem ser utilizadas para obtenção de queijos.

## **2.6 Proteases coagulantes de leite de origem microbiana**

Proteases, peptidases ou enzimas proteolíticas são denominações referentes às enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas (ANTÃO; MALCATA, 2005). É uma das mais importantes enzimas. Desempenham papel significativo em alguns mecanismos bioquímicos no processo de manutenção de todos os organismos e são amplamente utilizadas em indústrias farmacêuticas, têxteis, de couro, de detergentes e alimentícias (SIRITAPETAWEET et al., 2012).

Em alimentos desempenham importante ação, dado que a proteólise gerada pela enzima altera as propriedades químicas, físicas e biológicas das proteínas. A hidrólise de proteínas alimentares, por exemplo, é realizada para melhoria das características nutricionais, retardamento da deterioração, prevenção de interações indesejáveis, mudança de sabores e odores, remoção de fatores tóxicos ou inibitórios e modificação de diferentes propriedades funcionais, como solubilidade, formação de espuma, capacidades emulsificantes e coagulação (PARDO et al., 2000).

Especificamente na indústria láctea, as proteases podem ser adicionadas para objetivos que variam da coagulação do leite a processamento e maturação do queijo, melhoria da vida útil, até tratamento de águas residuais advindas da indústria de laticínios (TRANI et al., 2017). Todavia, a aplicação principal de proteases neste tipo de indústria está na fabricação de queijos, através da coagulação da caseína do leite. Essas proteases podem ser divididas em: coagulante de origem animal, coagulante de leite de origem microbiana e coagulante animal geneticamente modificado (AGUILAR et al., 2018).

O coagulante de origem animal é obtido na extração do abomaso de ruminantes jovens, como bezeros. O coagulante possui em sua composição as enzimas quimosina e pepsina em frações que dependem da idade dos animais quando abatidos bem como de sua dieta anterior. A quimosina é conhecida por sua alta especificidade na clivagem do glicomacropéptido da cadeia de  $\kappa$ -caseína, que desencadeia a desestabilização das micelas de caseína e, portanto, induz a coagulação do leite (JACOB et al., 2011).

Apesar de ser a mais utilizada, o consumo de coagulante de origem animal na contemporaneidade é fonte de preocupações éticas. Além disso, a oferta deste tipo de coagulante diminuiu e, com isso, a busca e interesse por outras enzimas capazes de coagular o leite para substituir àquelas extraídas do estômago de bezeros aumentaram consideravelmente (ALECRIM et al., 2014).

Dentro deste contexto, as fontes preferidas para obtenção de proteases coagulantes de leite são as de origem microbiana, devido à sua grande diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética. Além disso, a produção por micro-organismos tem uma melhor aceitação por pessoas cujos hábitos alimentares e crenças religiosas são contra o uso de enzimas de origem animal (MERHEB-DINI et al., 2010; BELMESSIKH et al., 2013)

Dessa forma, a busca por proteases coagulantes de leite produzidas por micro-organismos é bastante intensa, entretanto, não é atual. Em 1967, Arima, Iwasaki e Tamura realizavam um dos primeiros trabalhos científicos em busca de potenciais micro-organismos produtores de substâncias coagulantes de leite. Neste trabalho, em uma seleção entre 800 espécies de bactérias e fungos isolados de solo, encontraram o fungo filamentosso *Mucor pusillus* Lindt como um potente produtor de protease coagulante.

Em outro estudo, Sardinas (1968) realizou uma triagem microbiológica para encontrar uma enzima que pudesse substituir o coalho animal. Entre 381 bactérias e 540 fungos, apenas o fungo *Endothia parasitica* produziu um substituto adequado à função. Em estudos mais recentes, Merheb-Dini et al. (2010) trabalharam com o fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31, que demonstrou produção de enzimas coagulantes de leite com alta atividade de coagulação; e Silva et al. (2016), ao trabalharem com o fungo *Rhizomucor miehei*, encontraram excelente produção de protease que pode funcionar na coagulação do leite para preparação de queijos.

De todos os coagulantes microbianos bem conhecidos e utilizados para fabricação de queijo, a maioria são de origem fúngica. As enzimas coagulantes de leite produzidas por estas espécies podem ainda ser aplicadas industrialmente na síntese de peptídeos bioativos e

hidrolisados de caseína (HARBOE et al., 2010; SILVA et al., 2016). Durante a elaboração de queijos, as proteases coagulantes obtidas destas espécies podem liberar importantes componentes biologicamente ativos, originários da proteólise das micelas de caseína. A esses componentes é dado o nome de peptídeos bioativos (EGGER; MÉNARD, 2017).

## **2.7 Peptídeos bioativos**

As proteínas são um dos principais componentes dos alimentos, encontradas principalmente em produtos como o leite e seus derivados. Com frequência, elas têm suas propriedades nutricionais, funcionais e biológicas modificadas pelos procedimentos utilizados no processamento de alimentos. É o que ocorre, por exemplo, durante a fermentação necessária para a produção de iogurte ou queijo (TOLDRÁ et al., 2017).

As modificações nas proteínas ocasionadas por tais processos são, por sua vez, responsáveis por alguns aspectos. Dentre os principais está a liberação dos chamados peptídeos bioativos, que são pequenas sequências de aminoácidos que apresentam baixa massa molecular (LAFARGA; HAYES, 2014).

Além de liberados por essas modificações nas proteínas, os estudos também descrevem que os peptídeos bioativos podem ser obtidos por meios de outros mecanismos. É o caso, por exemplo, de peptídeos liberados pela hidrólise de proteases comerciais utilizadas em subprodutos da carne (RYDER et al., 2016) e durante a digestão gastrointestinal de alimentos como o queijo (PEPE et al., 2016). De modo geral, estão presentes em uma grande variedade de alimentos ricos em proteínas, que são consumidos regularmente pela população (EGGER; MÉNARD, 2017).

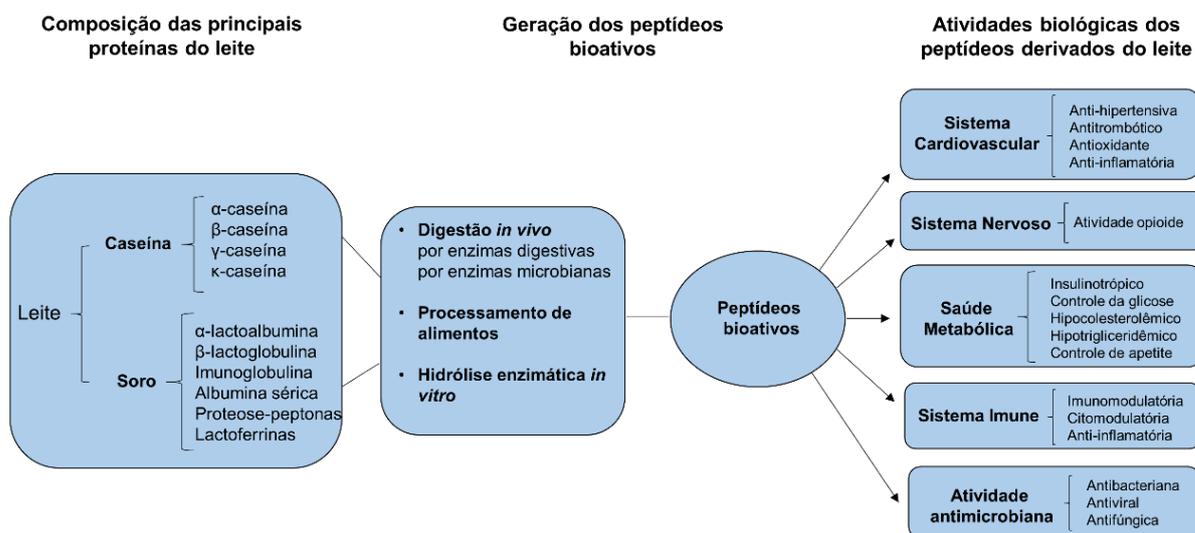
Na contemporaneidade, os peptídeos bioativos têm despertado amplo interesse e são bastante pesquisados, principalmente devido ao seu potencial na promoção de saúde humana em paralelo à nutrição. A relevância deles nesse quesito decorre do fato de serem fragmentos proteicos que podem interagir com receptores selecionados dentro de determinado organismo e, na interação, passam a regular funções fisiológicas importantes no corpo (MOHANTY et al., 2016).

As funções fisiológicas reguladas pelos peptídeos bioativos variam conforme a sequência de aminoácidos específica e sua localização dentro da proteína. Têm sido descritas por estudos que as reproduziram *in vitro*, por meio de ensaios bioquímicos, ou *in vivo*, com células e modelos animais e humanos. Nesse sentido, os peptídeos podem influenciar

numerosas respostas fisiológicas, tais como as atividades cardiovascular, digestiva, endócrina, imunológica e neurológica (MOHANTY, 2016).

Por causa da alta qualidade de suas proteínas e das possibilidades de transformação tecnológica e fermentação, o leite e seus derivados, como o queijo, são produtos conhecidos como fontes ideais de peptídeos bioativos (EGGER; MÉNARD, 2017). Além disso, um grande número de efeitos na promoção da saúde tem sido atribuído a peptídeos bioativos liberados desses produtos lácteos (MARCONE et al., 2017). A Figura 3 esquematiza e sumariza a geração e as funcionalidades fisiológicas dos peptídeos derivados das proteínas do leite.

**Figura 3.** Esquema da geração de peptídeos bioativos derivados das proteínas do leite.



Fonte: Adaptado de Marcone et al. (2017).

Além disso, como são elementos naturais, seu impacto na saúde deriva da questão de serem uma interessante alternativa aos efeitos colaterais e consequências ocasionadas pelo uso de peptídeos sintéticos e medicamentos no tratamento de doenças. Assim, seu desenvolvimento e uso trarão benefícios sociais e reduzirão os impactos econômicos advindos de questões como os maus hábitos e o envelhecimento da população (TOLDRÁ et al., 2017).

### 2.7.1 Peptídeos antioxidantes

Radicais livres são os produtos fisiológicos de processos metabólicos endógenos, como a respiração em organismos aeróbicos. Esses radicais exercem funções e estão envolvidos em

processos benéficos como a defesa contra infecções. No entanto, em níveis altos, esses radicais causam malefícios, pois atuam atacando ácidos nucleicos como o DNA e as proteínas, por exemplo. Em condições normais, tais espécies reativas ao oxigênio (ROS) são controladas por sistemas endógenos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Contudo, falhas nessa regulação podem ocorrer, fazendo com que esses sistemas não consigam proteger o organismo contra esses radicais reativos (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Tais desregulações apresentam como consequência o estresse oxidativo, condição na qual a produção de moléculas reativas ao oxigênio supera sua eliminação ou quando essa eliminação é inadequada. Por sua vez, o estresse oxidativo está relacionado ao desencadeamento, em seres humanos, de importantes doenças crônicas como as cardiovasculares, as neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), o câncer e também ao aceleramento do processo de envelhecimento (PEPE et al., 2016).

Esse quadro conduz à necessidade de consumo, pelos seres humanos, de substâncias antioxidantes capazes de prevenir e neutralizar o estresse oxidativo e seus graves efeitos, fortalecendo a capacidade antioxidante do corpo e ajudando-o a manter uma condição balanceada. Por esta razão, antioxidantes sintéticos são empregados como aditivos no alimento, mas o uso desses componentes químicos tem sido diminuído por apresentarem efeitos colaterais como dano ao DNA. Dessa forma, antioxidantes naturais vêm sendo bastante estudados e são considerados excelentes substâncias de auxílio ao sistema de defesa endógeno, em substituição aos sintéticos, na ação contra o estresse oxidativo, sem que apresentem efeitos colaterais (SILA; BOUGATEF, 2016).

Esses antioxidantes naturais podem ser encontrados nas proteínas dos alimentos e na forma de peptídeos bioativos. No intuito de desvelar seu funcionamento, métodos químicos com diferentes formas de ação foram desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante desses elementos. Essa variedade ocorre devido à complexidade das reações oxidativas que acontecem em sistemas biológicos e alimentícios (CHAKRABARTI et al., 2014).

O mecanismo de ação das proteínas alimentícias e os peptídeos pode ocorrer por inibição da peroxidação lipídica, eliminação de radicais livres, quelatação de íons metálicos de transição, dentre outros. Além disso, por meio da indução de genes, mantêm as células protegidas de danos causados por espécies reativas ao oxigênio, como já comentado anteriormente (SARMADI; ISMAIL, 2010).

As proteínas do leite, bem como os respectivos peptídeos bioativos liberados, estão entre os mais estudados no que diz respeito à capacidade antioxidante. Especificamente, as proteínas

do leite de cabra são também consideradas uma fonte de peptídeos bioativos com capacidade antioxidante. Estudos demonstraram alta atividade antioxidante em cinco peptídeos obtidos a partir de uma combinação de hidrólise neutra e alcalina da caseína do leite de cabra (LI et al., 2013) e excelente capacidade de eliminação de radicais superóxidos em peptídeos solúveis liberados de proteínas do leite de cabra hidrolisadas por pepsina (AHMED et al., 2015).

Estudos também vêm demonstrando alta atividade antioxidante em peptídeos obtidos de queijos. Silva et al. (2012) avaliaram peptídeos solúveis em água extraídos do queijo Coalho que apresentaram atividade antioxidante de 91,1%. Em outros estudos, os peptídeos solúveis em água de queijo tipo Parmigiano-Regiano apresentaram atividade de eliminação de radicais livres (BOTESSINI et al. 2013); atividade antioxidante, por meio de eliminação de radicais, em três peptídeos identificados no queijo tipo Burgos (TIMÓN et al., 2014) e significantes efeitos de redução do estresse oxidativo, tanto pela inibição de surgimento de espécies reativas ao oxigênio quanto pelo aumento da resposta antioxidante, em dois hexapeptídeos liberados da digestão gastrointestinal *in vitro* do queijo tipo Stracchino (PEPE et al., 2016).

Diante do exposto, esses achados demonstram que queijos podem representar uma fonte promissora de peptídeos antioxidantes, que podem atuar de maneira benéfica na saúde; ademais, ainda podem ser incorporados em produtos farmacêuticos ou em formulações nutraceuticas (SILVA et al., 2012).

### **2.7.2 Peptídeos anti-hipertensivos**

Estima-se que a hipertensão arterial (HA) afete um terço da população ocidental, tornando-a altamente prevalente e um importante fator de risco para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral (AVC), de doença cardíaca coronária, insuficiência cardíaca e falência renal nos Estados Unidos e em todo o mundo (BHAT; KUMAR; BHAT, 2017). No Brasil, a hipertensão atinge cerca de 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos e mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doenças cardiovasculares (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015).

Para tratamento da hipertensão, é importante o conhecimento sobre o controle da pressão arterial, realizado por meio de várias vias bioquímicas interativas, sendo o sistema renina-angiotensina considerado o mais importante. Neste sistema, a enzima conversora de angiotensina (ECA) desempenha um papel crítico na regulação da pressão arterial: converte a angiotensina I, um decapeptídeo inativo, em angiotensina II, um potente octapeptídeo vasoconstritor; além disso, a ECA também inativa a bradicinina, um vasodilatador anti-

hipertensivo, resultando dessa forma em aumento da pressão sanguínea. Assim, uma das ações frente à hipertensão é garantir a inibição da ação catalítica da ECA, reduzindo conseqüentemente a pressão arterial no corpo (PUCHALSKA; ALEGRE; LÓPEZ, 2014; MORA; ARISTOY; TOLDRÁ, 2016).

As drogas sintéticas captopril, enalapril e ramipril possuem ações baseadas na inibição da ECA, contudo, o uso desses medicamentos pode causar sérios efeitos colaterais, como tosse, erupções cutâneas, náuseas, vômitos e tonturas. Tal fato levou pesquisadores a buscar outros inibidores de ECA mais seguros, inovadores e baratos, que podem ser utilizados tanto na prevenção, como no tratamento de doenças cardiovasculares (RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2015).

Entre estas novas fontes de inibidores pesquisadas, peptídeos derivados do processamento de alimentos são alguns dos nutracêuticos emergentes aptos para redução da pressão arterial, principalmente aqueles derivados do leite. Em 2015 um estudo sugeriu que o consumo de laticínios como leite, iogurte, requeijão e queijo, como parte de uma alimentação saudável, se associou com menor elevação da pressão arterial e menor risco de desenvolvimento de hipertensão em 2.636 indivíduos ao longo do tempo (RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2015; WANG et al., 2015).

Os autores do estudo relataram que alguns nutrientes e substâncias bioativas presentes nestes laticínios podem contribuir em potenciais mecanismos subjacentes para redução da pressão arterial; os alimentos lácteos são fontes ricas de ácidos graxos de cadeia média e micronutrientes tais como cálcio, potássio e magnésio, além de vários peptídeos bioativos (WANG et al., 2015).

Especificamente em queijos, peptídeos com atividade inibitória da ECA já foram encontrados. No estudo realizado por Gomez-Ruiz et al. (2006), entre diferentes queijos espanhóis, elaborados com diversas tecnologias e leite de diferentes espécies, o queijo Cabrales apresentou atividade inibitória de ECA de 76,1%; em outra pesquisa, os extratos solúveis de queijos Asiago também apresentaram atividade inibidora de ECA (LIGNITTO et al., 2010).

Assim, muitos peptídeos bioativos derivados do leite apresentam eficientes atividades anti-hipertensivas *in vivo* e *in vitro* e há um interesse global no potencial terapêutico destes para o tratamento e prevenção da hipertensão arterial (BHAT; KUMAR; BHAT, 2017).

### 2.7.3 Peptídeos antimicrobianos

Nos últimos anos, a resistência de bactérias a múltiplas drogas e os potenciais riscos para a saúde representados pelos conservantes químicos, rotineiramente utilizados a fim de evitar deterioração microbiana, tornaram-se um grave e crescente problema. Diante deste contexto, pesquisadores do mundo inteiro buscam novas estratégias antimicrobianas. Um dos avanços mais interessantes das pesquisas realizadas é a descoberta dos chamados peptídeos antimicrobianos (TANG et al., 2015).

Esses peptídeos geralmente são pequenas moléculas catiônicas, formadas de 10 a 40 aminoácidos, comumente possuem uma fração substancial de resíduos hidrofóbicos. São encontrados em todos os organismos, como componentes-chave do sistema imune inato, essenciais na defesa do hospedeiro contra infecções (MALMSTEN et al., 2014). Podem ser obtidos também de variadas fontes e alguns estudos já os obtiveram de organismos aquáticos (TANG et al., 2015), plantas (CAPRIOTTI et al., 2015), leite (MCCANN et al., 2006) e ovos (MINE et al., 2004).

Vários mecanismos microbicidas podem ser encontrados nos peptídeos antimicrobianos. Danos em bactérias, incluindo inibição da síntese de DNA, RNA e proteica já foram relatados, entretanto o principal modo de ação dos peptídeos antimicrobianos é a ruptura das membranas bacterianas (BRODGEN, 2005). É consenso entre os pesquisadores que a interação entre os peptídeos e a célula alvo é passo importante para o desencadeamento da ação antimicrobiana, independentemente do tipo de atividade antimicrobiana (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

A atração inicial entre o peptídeo e a célula alvo ocorre através de ligação eletrostática do peptídeo catiônico e componentes das membranas celulares externas carregadas negativamente, tais como os lipopolissacarídeos em bactérias Gram negativas ou ácidos lipoteicóicos, nas Gram positivas (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

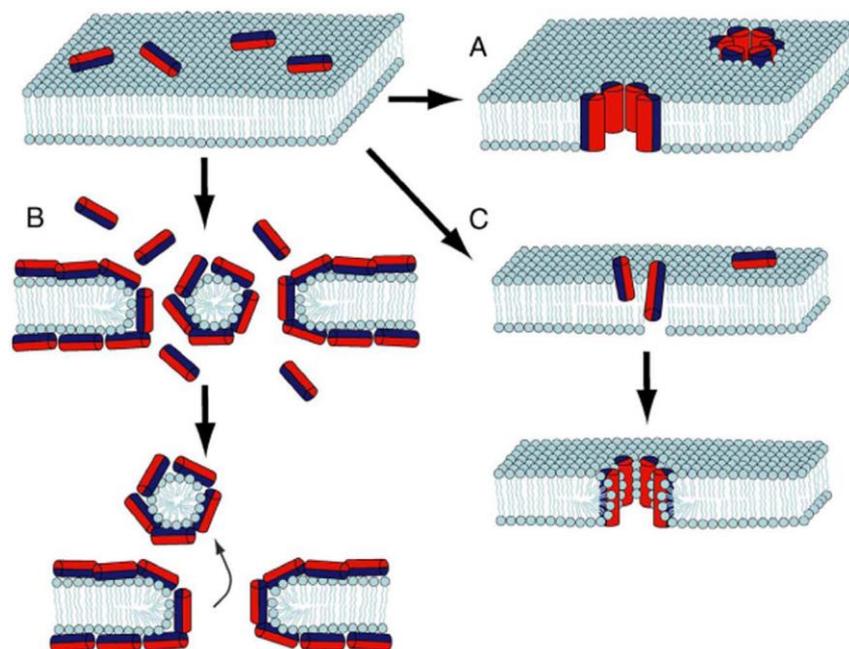
Para explicar a ação dos peptídeos na membrana celular microbiana, alguns modelos de inserção e impermeabilização dos peptídeos foram propostos pela literatura, sendo os modelos, *barrel stave*, *carpet* e *toroidal* os mais citados e estudados (BRODGEN, 2005). No modelo *barrel stave* (Figura 4A) há a penetração dos peptídeos na membrana plasmática dos microorganismos. Após fixação dos peptídeos nas membranas plasmáticas, ocorre a formação de um feixe na membrana com um lúmen central, assemelhando-se a um barril, onde as regiões hidrofóbicas dos peptídeos se alinham com o núcleo lipídico da bicamada da membrana, ao

passo que a face hidrolítica do peptídeo forma a porção interna de um poro aquoso (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA et al., 2017).

No modelo *carpet* (Figura 4B), os peptídeos recobrem a membrana e interagem apenas com as porções lipídicas das membranas celulares. Neste modelo, em altas concentrações, os peptídeos são orientados paralelamente à superfície, reorientados de forma que sua porção hidrofílica se direcione ao centro hidrofóbico da membrana, mantendo ainda contato com as cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos. A membrana dessa forma é desagregada semelhante a uma ação detergente, levando à formação de micelas (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA et al., 2017).

De forma parecida ao modelo *barrel stave*, o modelo *toroidal* (Figura 4C) forma poros na membrana celular microbiana. Entretanto, os peptídeos interagem somente com as porções lipídicas da membrana celular. Nesse modelo, os peptídeos inserem-se de forma perpendicular à camada lipídica, induzindo as monocamadas a se dobrarem continuamente através dos poros de modo que o núcleo aquoso esteja revestido pelos peptídeos inseridos e pelas cabeças dos grupos lipídicos também (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA et al., 2017)

**Figura 4.** Diferentes modelos de ação de peptídeos antimicrobianos: A – Modelo *barrel stave*; B – Modelo *carpet*; e C – Modelo *toroidal*. A porção vermelha do peptídeo representa a superfície hidrolítica, enquanto a porção azul a hidrofóbica.



Fonte: Adaptado de Travkova et al. (2017).

Apesar dos peptídeos apresentarem excelente atividade antimicrobiana, definir uma sequência única que possa servir de modelo ideal para formulação de antibióticos é difícil, pois a maioria dos peptídeos antimicrobianos descritos são extremamente diversos em suas propriedades estruturais. Além disso, o mecanismo molecular e a via de permeação da membrana celular microbiana dependem de outros parâmetros, como da composição da membrana lipídica inerente a cada micro-organismo e da concentração de peptídeos utilizada (SHAI et al., 2002; KOSIKOWSKA; LESNER, 2016).

Independente das vantagens dos peptídeos antimicrobianos, seu uso como agente terapêutico tem algumas limitações que precisam ser superadas. Estas incluem a falta de estabilidade (em estudos *in vivo*), potenciais toxicidades de alguns peptídeos (quer para células hospedeiras ou em modelos animais) e seu tamanho grande (> 20 aminoácidos), o que aumenta custos globais de produção e fabricação limitando o potencial dessas drogas como terapêuticas (FUENTES-NÚÑES et al., 2017).

Apesar da maioria dos estudos ser dedicada ao desenvolvimento de agentes terapêuticos, peptídeos antimicrobianos também são propostos como conservantes. Na indústria alimentícia, os peptídeos antimicrobianos, em especial aqueles produzidos por bactérias, tem sido pesquisados nos últimos anos devido ao seu potencial uso como conservantes naturais (ESPITIA et al., 2012).

Esses peptídeos podem ser adicionados diretamente à matriz alimentícia, como é o caso de bacteriocinas já disponíveis para venda, como o Microgard™. Além da adição direta, os peptídeos também já apresentaram potencial para serem incorporados em superfícies de corte e equipamentos envolvidos na preparação e processamento de alimentos, bem como em embalagens de alimentos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Obter e aplicar enzimas coagulantes de leite de *Aspergillus tamarisii* URM6599 e de origem comercial na elaboração de queijos caprinos Minas Frescal e avaliar as atividades biológicas de seus peptídeos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### **3.2.1 Capítulo I**

- Produzir enzimas coagulantes de leite a partir de *Aspergillus tamarisii* URM6599;
- Otimizar a produção das enzimas coagulantes de leite através de planejamento fatorial 2<sup>3</sup> e delineamento composto central (DCC);
- Avaliar a toxicidade do extrato enzimático do *Aspergillus tamarisii* URM6599 contendo as enzimas coagulantes de leite por meio de bioensaio utilizando *Artemia salina* e detectar a produção das aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 por *A. tamarisii* URM6599;
- Caracterizar as enzimas coagulantes de leite de *Aspergillus tamarisii* URM6599 em relação a temperatura e pH ótimos de coagulação, e estabilidade das proteases à temperatura e ao pH;
- Avaliar os efeitos de íons metálicos, de cloreto de sódio e cloreto de cálcio na coagulação do leite pelas proteases produzidas por *Aspergillus tamarisii* URM6599.

##### **3.2.2 Capítulo II**

- Elaborar queijos tipo Minas Frescal com leite caprino utilizando as enzimas coagulantes de leite obtidas de *A. tamarisii* URM6599 e de origem comerciais;
- Avaliar as atividades biológicas dos peptídeos obtidos dos queijos quanto às atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. Minas Frescal. São Paulo, 05 nov. 2017. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/nutricao\\_queijosbrasil\\_tipos\\_vaca.asp](http://www.abiq.com.br/nutricao_queijosbrasil_tipos_vaca.asp)>. Acesso em: 05 nov. 2017.
- AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- AHMED, A. S. et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80-88, 2015.
- ALECRIM, M. M. et al. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 151-157, 2014.
- AMIGO, L.; FONTECHA, J. Goat milk. In: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, vol. 3. 2 Ed. Oxford: Elsevier, 2011. 484-493
- ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant physiology and biochemistry**, v. 43, p. 637-650, 2005.
- Appendini, P.; Hotchkiss, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- ARIMA, K.; IWASAKI, S.; TAMURA, G. Milk clotting enzyme from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 31, p. 1421-1433, 1967.
- BALLINGER, K. Queijo fresco sem soro (processo sem utilização de ultrafiltrador). In: SEMINÁRIO TECNOLÓGICO DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS “CÂNDIDO TOSTES”, 2001, Juiz de Fora. p. 44-49. 2001.
- BELMESSIKH, A. et al. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 377-385, 2013.
- BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Antihypertensive Peptides of Animal Origin: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 566-578, 2017.

BOTTESINI, C. et al. Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, p. 953-958, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 que regulamenta a lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 4, de 1 de março de 2004. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento altera o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 que regulamenta a lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999 que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de alimentos. Brasília, 1999.

BRIGIDO, B. M. et al. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 63, p. 177-185, 2004.

BRODGEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 238-250, 2005.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 205-213, 2015.

CASTRO, J. M. et al. Biocheese: A food probiotic carrier. **BioMed Research International**, v. 2015, 11 pages, 2015.

CHAKRABARTI, S.; FOROUGH, J.; WU, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **BioMed Research International**, 11 pages, 2014.

CHANDAN, R. C. Dairy Ingredients for Food Processing: An Overview. In: Chandan, R. C; Kirala, A. **Dairy Ingredients for Food Processing**. 1. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. Cap. 1, 22-23.

CHANDAN, R. C.; KAPOOR, R. Manufacturing Outlines and Applications of Selected Cheese Varieties. In: Chandan, R. C; Kirala, A. **Dairy Ingredients for Food Processing**. 1. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011b. Cap. 11, 267-269.

CHANDAN, R. C.; KAPOOR, R. Principles of Cheese Technology. In: Chandan, R. C; Kirala, A. **Dairy Ingredients for Food Processing**. 1. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011a. Cap. 10, 225-226.

CORASSIN, C. H. et al. Introdução. In: Cruz, A. G. et al. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap. 1, 1-10.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265-2272, 2011.

DICKINSON, E. Caseins in emulsions: Interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 305-312, 1999.

EGGER, L.; MÉNARD, O. Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 116-121, 2017.

EGITO, A. S. et al. Processamento artesanal de queijo Minas Frescal fabricado com leite de cabra. Comunicado Técnico 102 – EMBRAPA, 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/747984>>. Acesso em: 28 out. 2017.

ESPITIA, P. J. P et al. Bioactive peptides: Synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 187-204, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>> Acesso em: 03 nov. 2017.

FOX, P. F. et al. Cheese: Historical Aspects. **Fundamentals of Cheese Science**. 2 Ed. Nova York: Springer, 2017b. Cap. 1-2, 20.

FOX, P. F. et al. Chemistry of Milk Constituents. **Fundamentals of Cheese Science**. 2 Ed. Nova York: Springer, 2017a. Cap. 4, 71-104.

FOX, P. F. et al. In: Fox, P. F.; Uniacke-Lowe, T.; McSweeney, P. L. H.; O'Mahony, J. A. Chemistry and Biochemistry of Cheese. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2 Ed. Nova York: Springer, 2015. Cap. 12, 499-522.

- FOX, P. F. In: Fox, P. F. Cheese: An Overview. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. 2 Ed. Nova York: Springer, 1993. Cap. 1, 1-2.
- FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 677-684, 2008.
- FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 178, p. 132-140, 2017.
- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. 1 Ed. São Paulo: Dipemar, 1994. 1-118.
- GALL C. F. Production Systems around the World. In: Park, Y. W. and Haenlein, G. F. W. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health**. 1. Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. Cap. 1, 9-10.
- GOBBA, C. et al. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, v. 39, p.2 8-40, 2014.
- GOMEZ-RUIZ, J. A. et al. Identification of ACE inhibitory peptides in different Spanish cheeses by Tandem Mass Spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 595–601, 2006.
- GUINEE, T. P. Salting and the role of salt in cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 99-109, 2004.
- HARBOE, M. et al. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. In: Law, B. A.; Tamime, A. Y. **Technology of Cheesemaking**. 2. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 3, 98-101.
- JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 14-33, 2011.
- JANDAL, J. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 22, p. 177-185, 1996.
- JANHØJ, T.; QVIST, K. B. The Formation of Cheese Curd. In: Law, B. A.; Tamime, A. Y. **Technology of Cheesemaking**. 2. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 4, 130-131.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 491-511, 2006.

- JOHNSON, M.; LAW, B. A. The Origins, Development and Basic Operations of Cheesemaking Technology. In: Law, B. A.; Tamime, A. Y. **Technology of Cheesemaking**. 2. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. Cap 2. 68-97.
- KAUR, N.; SINGH, D. P. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167-187, 2017.
- KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, p. 689-702, 2016.
- KÜSTER-BOLUDA, I.; VIDAL-CAPILLA, I. Consumer attitudes in the election of functional foods. **Spanish Journal of Marketing – ESIC**, v. 21, p. 65-70, 2017.
- LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, p. 227-239, 2014.
- LI, Z. et al. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4242-4251, 2013.
- LIGNITTO, L. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d’allevio cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 11–17, 2010.
- LÓPEZ-EXPÓSITO, I. et al. Health Effects of Cheese Components with a Focus on Bioactive Peptides. In: Frias, J.; Martinez-Villaluenga, C.; Peñas, E. **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. 1. Ed. London: Elsevier, 2017. Cap. 11, 231-273.
- MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 2, p. 199-204, 2014.
- MARCONE, S.; BELTON, O.; FITZGERALD, D. J. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, V. 83, P. 152-162, 2017.
- McCANN, K. B. et al. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha$ S1-casein. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 316-323, 2006.
- MERHEB-DINI, C. et al. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87-93, 2010.

- MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1088-1094, 2004.
- MOHAMMADIAN, M. et al. Nutraceutical Properties of Dairy Bioactive Peptides. In: WATSON, R. R.; COLLIER, R. J.; PREEDY, V. R. **Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan**. 1 Ed. Londres: Academic Press, 2017. Cap 25, 325-342.
- MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 577-583, 2016.
- MORA, L.; ARISTOY, M-C; TOLDRÁ, F. Bioactive Peptides in Foods. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Vol. 2. Oxford: Elsevier, 2016. Cap. -, 395-400.
- O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. **Advanced Dairy Chemistry**. 4. Ed. Nova York: Springer, 2013. Cap. 2, 43-85.
- ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. Queijos. In: Ordóñez Pereda, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 5, 85-104.
- PARDO, M. F. et al. Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p; 3795–3800, 2000.
- PARK, Y. W. et al. Rheological characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 73-87, 2007.
- PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 64, p. 19-25, 2009.
- PEPE, G. et al. Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 494-505, 2016.
- PEREIRA, D. B. C. et al. Proteínas. In: Cruz, A. G. et al. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap. 2, 15-51.

PUCHALSKAA, P.; ALEGRE, M. L. M.; LÓPEZ, M. C. G. Isolation and characterization of peptides with antihypertensive activity in foodstuffs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 521-551, 2015.

QUADROS, D. G. Leite de cabra: produção e qualidade. Universidade do Estado da Bahia, 2007. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/material/Quadros.pdf>>. Acesso em: 31/10/2017.

RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; JEYARAM, K. Production of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 2789-2800, 2015.

REDDY, K. V. R; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

REIS, F. S. et al. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 48-62, 2017.

RODRIGUES, F. Queijo Minas Frescal, Ricota ou Cottage? Qual o mais saudável?. Queijos no Brasil, Juiz de Fora, 07 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.queijosnobrasil.com.br/portal/tudo-sobre-queijo/236-queijo-minas-Frescal-ricota-ou-cottage-qual-a-melhor-opcao>> Acesso em: 5 nov. 2017.

ROHENKOHL, J. E. et al. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 39, p. 97-114, 2011.

RYDER, K. et al. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. **Food Chemistry**, v. 208, p. 42-50, 2016.

SANT'ANA, A. M. S. **Características nutricionais, tecnológicas e sensoriais de queijo Minas Frescal elaborado com leite de cabra, leite de vaca e sua mistura**. 2013. 78 f. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SARDINAS, J. L. Rennin Enzyme of *Endothia parasitica*. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 248-255, 1968.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.

- SCALA, L. C, MAGALHÃES, L. B., MACHADO, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: MOREIRA, S. M., PAOLA, A. V. **Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. 2. Ed. São Paulo: Manole, 2015. 780-5.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 43-56, 2005.
- SHAI, Y. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 715-725, 2002.
- SILA. A.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 10-26, 2016.
- SILANIKOVE, N. et al. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 110-124, 2010.
- SILVA, R. A. et al. Can artisanal "coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1533-1538, 2012.
- SILVA, R. R. et al. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 1059-1069, 2016.
- SIRITAPETAWE, J. et al. A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 7, p. 907-912, 2012.
- SLAČANAC, V. et al. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 171-189, 2010.
- TANG, W. et al. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. **Food Chemistry**, v. 168, p. 115-123, 2015.
- TIMÓN, M. L. et al. Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 359-365, 2014.
- TOLDRÁ, F. et al. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, no prelo, 2017.

TRANI, A. et al. Enzymes Applications for the Dairy Industry. In: Contò, f.; Nobile, M. A. D.; Faccia, M.; Zambrini, A. V.; Conte, A. **Advances in Dairy Products** 1. Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2017. Cap. 2.1.1, 166-168.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 521-532, 2017.

VINHA, M. B. et al. Fatores socioeconômicos da produção de queijo Minas Frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, v. 40, 2023-2029, 2010.

VISIOLI, F. Dairy Products: Dietary and Medical Importance. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Vol. 2. Oxford: Elsevier, 2016. Cap. -, 352-355.

VISOTTO, R. G. et al. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, p. 8-15, 2011.

WANG, H. et al. Longitudinal association of dairy consumption with the changes in blood pressure and the risk of incident hypertension: the Framingham Heart Study. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1887–1899, 2015.

ZENEBE, T. et al. Review on medicinal and nutritional values of goat milk. **Academic Journal of Nutrition**, v. 3, p. 30-39, 2014.

ZERVAS, G.; TSIPLAKOU, E. Goat Milk. In: Park, Y. W. e Haenlein, G. F. W. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health**. 1. Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. Cap. 23, 498-502.

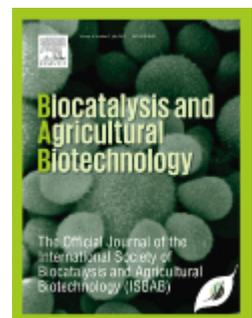
ZERVAS, G.; TSIPLAKOU, E. The effect of feeding systems on the characteristics of products from small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 140-149, 2011.

# CAPÍTULO I

**Novas enzimas de origem fúngica com ação coagulante de leite: otimização da produção, caracterização e avaliação de toxicidade do extrato enzimático de *Aspergillus tamarii* URM6599**

A ser submetido na:

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology



<https://www.elsevier.com/journals/biocatalysis-and-agricultural-biotechnology>

Novas enzimas de origem fúngica com ação coagulante de leite: otimização da produção, caracterização e avaliação de toxicidade do extrato enzimático de *Aspergillus tamaritii*

URM6599

Alana Emilia Soares de França Queiroz<sup>1</sup>; Natalia da Silva Oliveira<sup>2</sup>; Anna Carolina da Silva<sup>1</sup>; Amanda Reges de Sena<sup>3</sup>; Alane Silva de Aquino dos Santos<sup>4</sup>, Girliane Regina da Silva<sup>5</sup>; José Erick Galindo Gomes<sup>6</sup>; Cristina Maria de Souza-Motta<sup>7</sup>; Keila Aparecida Moreira<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. R. Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Federal de Pernambuco, Fazenda Sapé, s/n, - Zona Rural, CEP: 55560-000, Barreiros-PE, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. R. Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.

<sup>6</sup>Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto - SP, Brasil

<sup>7</sup>Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária,

\* Autor para correspondência: Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil. Telefone: (+5587) 37645581; FAX: 37645500; e-mail: [moreirakeila@hotmail.com](mailto:moreirakeila@hotmail.com)

## RESUMO

Neste estudo, proteases coagulantes de leite foram produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus tamarii* URM6599 em meio submerso, utilizando meio de soja (MS), como meio base. Para produção das proteases coagulantes do leite, foram empregados um planejamento fatorial  $2^3$ , objetivando a seleção de variáveis influenciadoras na produção enzimática, dentre  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  e glicose; e um delineamento composto central (DCC), empregando metodologia de superfície de resposta para obtenção das melhores condições de produção. A liberação de micotoxinas pelo micro-organismo foi avaliada por meio do teste em meio coco e meio extrato de levedura e sacarose e o extrato enzimático também avaliado quanto à presença de aflatoxinas (B1, G1, B2 e G2), por cromatografia líquida de alta eficiência, e sua toxicidade por meio de bioensaio com *Artemia salina*. As variáveis que apresentaram influência na produção enzimática foram o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e a glicose e o DCC foi realizado com as duas variáveis, otimizando a produção enzimática para uma atividade de  $289,16 \text{ U.mL}^{-1}$ . O micro-organismo não liberou micotoxinas nos ensaios em meio coco e meio extrato de levedura e sacarose e não houve a produção de aflatoxinas no extrato enzimático. A DL50 dos náuplios de *A. salina* foi de  $683 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , considerada de baixa toxicidade. O extrato enzimático do micro-organismo apresentou atuação ótima aos  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 5,5; atividade coagulante acima dos 50% em temperaturas abaixo de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e atividade acima dos 60% em valores de pH ácidos e alcalinos, por 1 hora. O extrato também foi inibido por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e pepstatina A, sugerindo a existência de serino e aspártico proteases no extrato bruto. As enzimas também foram tolerantes a íons metálicos,  $\text{NaCl}$  e  $\text{CaCl}_2$ . As proteases presentes no extrato enzimático exibem atividade coagulante promissora e os resultados encontrados sugerem a possibilidade de uso dessas enzimas na produção de queijos.

**Palavras-chave:** proteases coagulantes, coagulação de leite, otimização, fungo filamentoso

## 1. INTRODUÇÃO

Na fabricação de queijos a coagulação e a maturação são processos fundamentais, pois originam as principais propriedades organolépticas, a textura, sabor e aroma no produto final. Em ambos os processos, as proteases ou peptidases desempenham importante papel (Feijoo-Siota et al., 2014).

Industrialmente, o coalho de bezerras, um complexo de enzimas produzidas no abomaso de ruminantes jovens alimentados com leite, é tradicionalmente utilizado como agente coagulante do leite. Neste complexo enzimático, a quimosina ou renina (EC 3.4.23.4) é o principal componente atuante na coagulação. Em síntese, a ação da quimosina resulta na separação do leite em duas fases: uma sólida, chamada de coalhada e outra líquida, que é o soro do leite (Kumar et al., 2010).

Todavia, a indústria de produção de queijos atualmente enfrenta dificuldades quanto ao uso do coalho obtido do abomaso de bezerras: enquanto a demanda por queijos aumentou, a oferta do coalho diminuiu de forma drástica, com elevação concomitante de seu preço (Amer et al., 2015; Shah et al., 2014).

Assim, a busca por coagulantes alternativos é um dos principais focos de pesquisas na área de produção de queijos, em especial, por coagulantes recombinantes ou de origem microbiana, sendo o último considerado uma fonte mais promissora por apresentar produção mais barata, maior diversidade bioquímica e modificação genética mais fácil (El-Tanboly et al., 2013).

Coagulantes de origem microbiana podem ser facilmente obtidos por fermentação e, por isso, não possuem maiores limitações de produção. Como as enzimas não são derivadas de tecido ruminal, não há restrições quanto a encefalopatia espongiforme bovina; além disso, queijos produzidos com coagulantes microbianos geralmente são aceitos por lactovegetarianos (Jacob et al., 2011).

Muitas espécies de micro-organismos são conhecidas por produzir enzimas coagulantes de leite que podem potencialmente substituir o coalho de bezerros. Bactérias (Ahmed et al., 2016; Wehaidy et al., 2016; Hang et al., 2016) e fungos (Ayana et al., 2015; Merheb-Dini et al., 2010; Shamtsyan et al., 2014) já foram citados na literatura como produtores dessas enzimas.

Benlounissi et al. (2014) relataram a produção de enzimas coagulantes de leite produzidas por uma estirpe de *Aspergillus tamaris* e demonstraram o potencial deste fungo filamentoso para a indústria de queijos. O presente estudo, portanto, apresenta-se como consolidação do possível potencial dessa espécie como produtora dessas enzimas.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi produzir enzimas coagulantes do leite através do fungo filamentoso *Aspergillus tamaris* URM6599, otimizar a produção enzimática do fungo, avaliar a toxicidade do extrato enzimático produzido pelo micro-organismo através da detecção de micotoxinas e por bioensaio envolvendo *A. salina* e caracterizar parcialmente as enzimas coagulantes quanto às suas propriedades bioquímicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo, reativação, meio de manutenção e preparação do inóculo

*Aspergillus tamaris* URM6599 foi obtido da coleção de culturas Micoteca – URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Foi reativado por inoculação de fragmento preservado, utilizando caldo glicosado e mantido a 28 °C por 24 horas até crescimento. Posteriormente, foi repicado e mantido em meio Ágar Batata Dextrose em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 horas.

O inóculo utilizado para as fermentações e demais testes foi preparado através da adição de solução de Tween 80 a 0,1% aos frascos contendo o micro-organismo esporulado (96 horas de crescimento) e padronizado com  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, em câmara de Neubauer.

## 2.2 Avaliação da produção de micotoxinas por *A. tamaritii* URM6599 em meio Ágar Coco

O teste foi realizado de acordo com metodologia desenvolvida por Lin e Dianese (1976) com modificações. Para obtenção do meio, 200 mL de leite de coco (Socôco®) foram diluídos em 800 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,9 com hidróxido de sódio a 2 M e 15 gramas de ágar foram adicionados. Após esterilização em autoclave por 20 minutos a 120 °C, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis. Em seguida, o centro da placa foi inoculado com 5 µL de suspensão de esporos a  $10^4$ .mL<sup>-1</sup> de *A. tamaritii* URM6599 com posterior incubação no escuro a 28 °C durante 7 dias.

A detecção da liberação de aflatoxinas nas placas foi avaliada após sete dias de crescimento, observando-se a presença de um halo fluorescente de cor azulada no reverso da colônia contendo o fungo crescido, quando submetidas a luz ultravioleta (365 nm). O ensaio foi realizado em duplicata.

## 2.3 Avaliação da produção de micotoxinas por *A. tamaritii* URM6599 por teste de vapor de amônio

O teste foi realizado conforme metodologias propostas por Saito e Machida (1999) e Kumar et al. (2007). *A. tamaritii* URM6599 foi inoculado no centro das placas (5 µL a  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) contendo meio Ágar Coco e Ágar Extrato de Levedura e Sacarose (2% de extrato de levedura, 20% de sacarose e 2% de ágar) e incubado ao abrigo da luz a 28 °C. Após 32 e 168 horas, 2 mL de hidróxido de amônio a 25% foram adicionados a cada conjunto de placas, divididas por período de incubação.

Caso a espécie fosse produtora de aflatoxinas, a cor do reverso da colônia ficaria de rosa a vermelho; caso não, nenhuma alteração de cor seria detectada. O ensaio foi realizado em duplicata para cada período de incubação.

#### 2.4 Avaliação da presença de micotoxinas no extrato enzimático bruto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após otimização da produção enzimática, o extrato enzimático foi analisado via CLAE quanto à presença das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. As toxinas foram obtidas de fonte comercial (Sigma-Aldich®) e preparadas pela dissolução em tolueno e acetonitrila (9:1 v/v) para uma concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. As aflatoxinas B1 e G1 foram derivatizadas após a dissolução e imediatamente antes do uso, processo no qual as substâncias passam a emitir fluorescência e podem ser detectadas na análise, seguindo metodologia de Iqbal et al. (2016).

Posteriormente, a solução de cada aflatoxina foi diluída em metanol em concentrações que variaram de 0,005 a 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>, para construção da curva de calibração e determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) por meio do software LabSolutions LC (Shimadzu®).

A amostra do extrato enzimático foi preparada por extração líquido-líquido utilizando clorofórmio como solvente, em uma concentração 1:1 (v/v). Em 15 mL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 15 mL de clorofórmio, com posterior incubação e agitação leve e constante do sistema em funil de separação. Transcorridos 15 minutos, a fase inferior (orgânica) foi recuperada, evaporada a 40 °C e dissolvida em 1 mL de metanol. A amostra foi filtrada com filtro de 0,22 µm e acondicionada a - 20 °C até a análise.

Para detecção das micotoxinas foi utilizada coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm) 5 µm de tamanho de partícula (Phenomenex, Torrance, Califórnia, Estados Unidos) conectada ao HPLC modelo LC20A, Prominence (Shimadzu, Japão).

A separação cromatográfica seguiu metodologia de Hepsag et al. (2014), com modificações. Quantidade de 20 µL das amostras e das aflatoxinas foram eluídas por meio de fase móvel constituída por água-acetonitrila-metanol (6:2:3) na presença de brometo de potássio (120 mg.L<sup>-1</sup>) e ácido nítrico (350 µL.L<sup>-1</sup>), de forma isocrática e com fluxo a 1 mL.min<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. O detector de fluorescência foi utilizado nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 440 nm, respectivamente.

Após análise, o cromatograma da amostra foi analisado quanto à liberação ou não de aflatoxinas no extrato enzimático por meio da presença ou não de picos correspondentes às soluções-padrão das aflatoxinas.

## 2.5 Determinação da toxicidade do extrato enzimático por bioensaio com *Artemia salina*

Bioensaio com larvas de *Artemia salina* foi realizado, de acordo com metodologia de Meyer et al. (1982), com algumas modificações. Cerca de 25 mg de ovos de *A. salina* foram eclodidos em 500 mL de água marinha artificial (Natural Ocean<sup>®</sup>), preparada de acordo com instruções do fabricante. Os ovos foram submetidos a ciclos de 12/12 horas de escuro/claro até eclosão, ocorrida em 24 horas a 25 °C. As larvas recém eclodidas foram coletadas com ajuda de pipeta de Pasteur e utilizadas para o ensaio de letalidade.

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 35 mL contendo 10 larvas/tubo, expostas ao extrato enzimático liofilizado diluído em água marinha artificial em sete concentrações, que variaram entre 25 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. A concentração final foi calculada levando em consideração o volume de 10 mL para cada ensaio. Após 24 horas, a taxa de sobrevivência (%) foi analisada e a dose requerida para morte de 50% das larvas (DL50) foi determinada. Água marinha artificial foi utilizada como controle negativo. O bioensaio artemicidal foi realizado em triplicata.

## 2.6 Produção das enzimas coagulantes do leite

### 2.6.1 Fermentação submersa e influência dos componentes do meio fermentativo na produção enzimática

O meio base utilizado para a produção das proteases coagulantes de leite foi o meio de soja (MS), proposto por Porto et al. (1996), com modificações: farinha de soja (6%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

(0,435%),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,1%),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,06%), glicose (1%), solução mineral (a 0,2%, constituído por 0,1% de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em água destilada) e pH inicial ajustado para 7,2. Um planeamento estatístico fatorial completo  $2^3$  foi realizado e três componentes do meio MS ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  e glicose) foram estudados, como variáveis independentes, quanto a sua influência na produção das enzimas coagulantes do leite. O planeamento foi avaliado em dois níveis (+1 e -1), de acordo com a matriz demonstrada na Tabela 1 e teve como variável resposta a atividade coagulante de leite ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

A produção das enzimas ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, contendo 25 mL dos meios de produção MS. A fermentação transcorreu por 120 horas em incubadora refrigerada a 30 °C, sob agitação de 110 rpm, valores fixados por estudos realizados anteriormente. A interrupção da fermentação foi realizada por filtração do conteúdo metabólico dos sistemas fermentativos e as amostras foram armazenadas a -20 °C até posteriores análises.

#### 2.6.2 Otimização da produção enzimática através de delineamento composto central

As variáveis significativas e seus efeitos de interação apresentadas no planeamento fatorial completo  $2^3$  foram analisados pela metodologia de superfície de resposta (MSR) através do delineamento composto central (DCC), objetivando-se otimizar a produção das enzimas coagulantes do leite. O delineamento experimental foi composto por 11 ensaios, incluindo os pontos centrais e axiais. As variáveis independentes foram estudadas em cinco níveis diferentes (-1,414; -1; 0; +1; +1,414) (Tabela 2).

#### 2.6.3 Validação do modelo estatístico

Objetivando a confirmação das condições ideais de produção previstas pelo DCC, experimentos adicionais foram realizados para validar o modelo proposto. Na preparação dos experimentos para validação, os componentes do meio que não foram otimizados e os que não

foram significativos para a produção enzimática ficaram em seus níveis pré-estabelecidos e em seu nível mínimo, respectivamente.

## 2.7 Atividade coagulante de leite

A atividade coagulante do leite foi realizada de acordo com metodologia de Arima et al. (1970), com modificações. Volume de 1 mL de solução de leite desnatado (Camponesa<sup>®</sup>) a 10%, em 0,01 M de CaCl<sub>2</sub>, foi pré-incubado a 35 °C por 10 minutos. Uma quantidade de 100 µL do extrato enzimático obtido das fermentações dos planejamentos foram adicionados à solução e o tempo de formação dos primeiros coágulos, contabilizado. Para observar a formação dos coágulos, empregou-se rotação manual do tubo de ensaio. O tempo, em minutos, até formação dos primeiros coágulos, foi utilizado para cálculo da atividade coagulante do leite. Definiu-se que uma unidade de enzima coagulante (U.mL<sup>-1</sup>) correspondeu a quantidade de enzima requerida para coagular 1 mL do substrato em 40 minutos a 35 °C.

## 2.8 Efeitos da temperatura e do pH na atividade coagulante do extrato enzimático e na estabilidade enzimática

A temperatura ótima, correspondente à máxima atividade coagulante de leite do extrato enzimático, foi determinada por incubação do ensaio de atividade coagulante com amostras do extrato enzimático em diferentes temperaturas, variando de 20 a 75 °C, com intervalos de 5 °C. Já para determinar o pH ótimo, utilizou-se diferentes soluções tampão a 0,2 M: acetato (pH 5,5 e 6,0), Tris-HCl (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) e glicina-NaOH (pH 8,0; 8,5 e 9,0).

Na estabilidade ao pH, o extrato bruto enzimático foi previamente incubado (1:1) por 1 hora nas soluções tampão anteriormente utilizadas. Para a estabilidade a temperatura, o extrato foi submetido a temperaturas variando de 20 a 80 °C, com intervalos de 5 °C, por 1 hora. Para cálculo da atividade residual, a atividade coagulante do extrato enzimático realizada sob as

melhores condições de pH e temperatura encontradas no ensaio anterior foi considerada como 100% de atividade.

## 2.9 Efeitos da concentração de $\text{CaCl}_2$ e $\text{NaCl}$ na atividade coagulante do extrato enzimático

O efeito da concentração de  $\text{CaCl}_2$  foi determinado de acordo com metodologia proposta por Merheb-Dini et al. (2010). A atividade coagulante foi determinada com utilização de concentrações crescentes da solução de cloreto de cálcio (0; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 M). O resultado foi expresso em atividade relativa (%), sendo a atividade referência (100%) o melhor resultado obtido no ensaio. Nas mesmas concentrações supracitadas, determinou-se o efeito da concentração de  $\text{NaCl}$  sob a atividade coagulante do leite, e os resultados também foram expressos em atividade relativa (%).

## 2.10 Efeitos de inibidores de proteases e íons sobre a atividade coagulante do leite

Ao extrato enzimático, os seguintes inibidores de proteases foram incubados por 30 minutos a 25 °C: inibidor de serino protease (fluoreto de fenilmetilsulfonil a 10 mM), inibidor de metaloprotease (ácido etilenodiaminotetracético a 10 mM), inibidor de cisteína protease (ácido iodoacético a 10 mM) e inibidor de protease aspártica (pepstatina A a 0,1 mM). Após incubação, as atividades coagulantes do leite foram determinadas e comparadas a uma amostra controle, que foi incubada sem inibidores. Para cálculo da atividade coagulante do leite relativa (%), a amostra controle foi considerada como 100% de atividade.

Diferentes íons metálicos ( $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) foram testados quanto à sua capacidade de ativar ou inibir a atividade coagulante do leite. O extrato bruto foi incubado a 25 °C durante 30 minutos com os íons metálicos, levando em consideração a concentração final de 10 mM para cada. A atividade de coagulação do leite obtido sem os íons

metálicos foi considerada 100% de atividade e a atividade coagulante foi expressa em atividade relativa (%).

## 2.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> e do delineamento composto central foram realizadas no software Statistica 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA), com o objetivo de indicar os efeitos estatisticamente significativos e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Para obtenção da DL50 no bioensaio com *A. salina*, foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber no software R 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016) a 95% de significância.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação da produção de micotoxinas por *A. tamarii* URM6599

*A. tamarii* URM6599 não liberou aflatoxinas nos testes realizados, sem detecção de halo de cor azul em meio Ágar Coco (Figura 1A). Ademais, não foram observadas mudanças de cor no reverso das placas no teste de vapor amônio em nenhum período de incubação, inferindo que não houve liberação de aflatoxinas nos meios de extrato de levedura e sacarose (Figura 1B), e Ágar Coco (Figura 1C), quando aplicado hidróxido de amônio a 25%.

Micotoxinas são substâncias metabólicas secundárias de fungos e possuem características fortes de toxicidade, mesmo em quantidades insignificantes. Causam redução da imunidade geral de um organismo, prejudicam a fisiologia dos rins, do fígado e promovem desordens nos sistemas nervoso, gastrointestinal e sanguíneo (Bennett e Klich, 2003; Bhat et al., 2010; Chkuaseli et al., 2016).

As aflatoxinas, em especial, são um grupo de micotoxinas produzidas por algumas espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os membros mais importantes desse grupo são as aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2),

caracterizados como compostos altamente tóxicos e cancerígenos, acometendo animais e humanos na mesma proporção (Lai et al., 2015; Richard, 2007).

Vários métodos são empregados para a detecção da produção de aflatoxinas por fungos filamentosos. Em particular, métodos analíticos incluindo cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou métodos de imunoenaios, como ELISA (do inglês “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”) são os mais utilizados. São precisos e confiáveis, entretanto exigem equipamentos e suprimentos laboratoriais caros (Nasir e Jolley, 2002).

Neste contexto, a utilização de técnicas qualitativas, em que há o cultivo dos fungos, é uma alternativa mais barata, rápida e econômica, sem requerimento de habilidades avançadas, importante como ferramenta para seleção rápida de micro-organismos não micotoxigênicos. Esses métodos de detecção de aflatoxinas podem ser classificados quanto a presença de halo azul sob luz ultravioleta, pela presença de pigmento amarelo no meio ou por mudança de cor do reverso da colônia quando exposta a hidróxido de amônio (Moradi et al., 2017).

O fato da espécie *A. tamaritii* URM6599 não ter apresentado liberação de aflatoxinas é de fundamental importância, já que o presente estudo propõe a utilização de enzimas coagulantes de leite produzidas por esta cepa na produção de queijos.

De forma semelhante a este estudo, Silva et al. (2016a) avaliaram uma outra estirpe de *A. tamaritii* quanto à produção de aflatoxinas em placas e também encontraram que este não é um produtor de aflatoxinas, reforçando os achados deste trabalho. Diante deste resultado, foi possível dar continuidade à produção de proteases coagulantes do leite por *A. tamaritii* URM6599.

### 3.2 Detecção de aflatoxinas por *A. tamarii* URM6599 em extrato enzimático por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi realizada uma segunda análise quanto à detecção de aflatoxinas no extrato enzimático obtido após processo de otimização. Após elaboração da curva de calibração de cada micotoxina, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados e para os hemiacetais da aflatoxina B1 foram de 0,008 e 0,026  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (primeiro pico) e 0,014 e 0,044  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (segundo pico), respectivamente; para os hemiacetais da aflatoxina G1 de 0,017 e 0,051  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (primeiro pico) e 0,018 e 0,055  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (segundo pico); para a aflatoxina B2 de 0,014 e 0,044  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; e para a aflatoxina G2 os limites foram de 0,013 e 0,040  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Na análise não foram detectadas aflatoxinas no extrato enzimático do *A. tamarii* URM6599 (Figura 2). Após derivatização com ácido trifluoroacético, as aflatoxinas B1 (AFB1) e G1 (AFG1) apresentaram dois picos cada, relacionados aos seus hemiacetais. O primeiro pico da AFG1 surgiu aos 14 minutos de análise e o segundo, aos 16 minutos (coloridos de azul claro); o primeiro pico da AFB1 surgiu aos 19 minutos e o segundo aos 22 minutos (coloridos de rosa). As AFB2 (colorido de marrom) e a AFG2 (colorido de azul escuro) apresentaram tempo de retenção aos 17 e 18,5 minutos, respectivamente.

A amostra enzimática (linha preta), não apresentou nenhum pico relacionado às aflatoxinas, sugerindo que as condições de produção das enzimas coagulantes pelo micro-organismo não induziram a liberação dessas micotoxinas. A biossíntese de aflatoxinas por um micro-organismo é influenciada por vários fatores, como atividade de água, temperatura, pH, nutrientes, entre outros (Wang et al., 2017).

Em relação à temperatura, a produção de aflatoxinas pode ocorrer, por exemplo, em uma variável faixa de temperatura, de 15 a 35 °C (Astoreca et al., 2014). A temperatura em que ocorreu a fermentação realizada neste estudo foi de 30 °C, entretanto é necessário considerar

que a biossíntese de aflatoxinas pode ser influenciada por interações entre outros componentes do sistema fermentativo.

O meio utilizado para a produção das enzimas coagulantes de leite neste estudo foi elaborado com pH inicial neutro (valor de 7,2) e, ao final da fermentação, apresentou pH próximo à neutralidade, com pH de 6,83 (dados não mostrados). Tais condições podem ter influenciado nos resultados do presente estudo, já que geralmente a produção de aflatoxinas ocorre em pH ácido, em especial abaixo de 4, e quanto menor o pH, maior a produção das toxinas (Luchese e Harrigan, 1990).

### 3.3 Determinação da toxicidade do extrato enzimático bruto por bioensaio com *Artemia salina*

A letalidade de organismos simples, como *A. salina*, tem sido utilizada para monitoramento relativamente simples e rápido de efeitos de toxicidade de substâncias de interesse (Libralato et al., 2016; Meyer et al., 1982). No presente estudo, o bioensaio utilizando náuplios de *A. salina* foi conduzido para determinar a segurança do uso do extrato bruto enzimático do *A. tamaritii* URM6599 para a produção de queijos.

A Figura 3 apresenta o efeito dose-resposta do extrato bruto enzimático. Até a concentração de 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não houve mortalidade dos náuplios; entretanto, a partir de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a mortalidade foi crescente, chegando a mortalidade de 100% nos ensaios com 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com DL50 determinada em 683,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Para efeito de avaliação de toxicidade, um composto considerado de baixa toxicidade apresenta DL50 superior a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; moderada toxicidade para valores entre 100 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e muito tóxico quando a DL50 for inferior a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Meyer et al., 1982). Dessa forma, o extrato bruto enzimático produzido por *A. tamaritii* URM6599 apresentou baixa toxicidade, indicando que além das enzimas coagulantes de leite, há outros compostos que podem apresentar efeitos deletérios aos náuplios de *A. salina*.

### 3.4 Produção e otimização de proteases coagulantes de leite de *A. tamaritii* URM6599

As variáveis  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  e glicose foram analisadas quanto a influência na produção das enzimas coagulantes do leite de *A. tamaritii* URM6599. Nos diferentes ensaios propostos pelo planejamento fatorial completo  $2^3$  a atividade enzimática variou de  $12,16 \pm 0,51$ , no ensaio 3, a  $263,74 \pm 0,0 \text{ U.mL}^{-1}$ , no ensaio 8, com aumento de 21 vezes na produção enzimática do micro-organismo (Tabela 3). A análise de variância demonstrou que, a 95% de confiança, a regressão foi significativa, uma vez que o  $F_{\text{cal}}$  (20,76) foi maior que o  $F_{\text{tab}}$  (6,16), enquanto a falta de ajuste não foi significativa no mesmo nível de confiança ( $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ ) (Tabela 4). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,9658, indicando que 96,58% da variação total das respostas foi explicada pelo modelo utilizado.

Os efeitos das três variáveis estudadas na produção enzimática foram analisados (Tabela 5) e observou-se que as variáveis independentes  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e glicose foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), bem como a interação entre as mesmas, para a produção das enzimas coagulantes do leite. O  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e a glicose apresentaram efeitos negativos, indicando que a redução destes compostos no meio proporcionaria ao micro-organismo uma maior produção enzimática. Assim, para a otimização da produção enzimática, um delineamento composto central foi executado, diminuindo as concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e glicose.

As duas variáveis significativas para a produção enzimática foram avaliadas por meio de um planejamento do tipo DCC completo  $2^2$ , com quatro pontos axiais ( $\alpha = 1,41$ ), três pontos centrais e quatro fatoriais, totalizando 11 ensaios; o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  variou de 0,0 a 0,002 (g/25 mL de meio) e a glicose de 0,06 a 0,1 (g/25 mL de meio) (Tabela 2). Na Tabela 6 estão apresentados os ensaios realizados e os resultados obtidos e preditos pelo modelo para cada um deles. A maior produção enzimática ocorreu no ponto central (ensaio 8), composto por 0,001 gramas de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,08 gramas de glicose, com produção de  $289,16 \text{ U.mL}^{-1}$ . Este resultado foi 23,77 vezes maior do que o observado no menor resultado do planejamento fatorial completo  $2^3$ , que

apresentou 12,16 U.mL<sup>-1</sup> e 1,1 vezes maior que o observado no maior resultado do mesmo planejamento (ensaio 3, que apresentou 263,74 U.mL<sup>-1</sup>).

Os efeitos das variáveis foram estimados e estão apresentados na Tabela 7. Em termos quadráticos o NH<sub>4</sub>Cl e a glicose apresentaram efeitos negativos; em termos lineares, somente a glicose apresentou efeito significativo negativo. Também foi realizada análise de regressão múltipla que indicou que a produção enzimática segue uma equação polinomial de segunda ordem com seis coeficientes:

$$\text{Produção enzimática (U.mL}^{-1}\text{)} = -444,24 + 13359,64X_1 - 16846996,12X_1^2 + 19328,40X_2 - 130332,38X_2^2 + 247036,22X_1X_2$$

**(Equação 1)**

Onde, X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> são NH<sub>4</sub>Cl e glicose, respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) do modelo está apresentada na Tabela 8. O teste F de Fisher indicou que a Equação 1 ajustada foi estatisticamente significativa ( $F_{cal} > F_{tab}$ ) e que a falta de ajuste mostrou boa concordância ( $F_{cal} < F_{tab}$ ) entre o modelo de resposta predita e os valores experimentais. A qualidade do ajuste do modelo foi medida pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que apresentou valor de 0,8794, indicando que 87,94% da variação total na atividade residual foi explicada pelo modelo ajustado.

A determinação dos níveis ótimos das variáveis independentes para máxima produção enzimática foi obtida por meio do gráfico de superfície resposta do modelo (Figura 4). A diminuição do NH<sub>4</sub>Cl da máxima concentração utilizada no DCC, de 0,002 para 0,001 gramas promoveu aumento da produção enzimática por *A. tamaritii* URM6599; da mesma forma, a diminuição da glicose também apresentou a mesma tendência. Através da análise do gráfico de superfície de resposta foi possível determinar que a máxima produção de enzima coagulante

(287,36 U.mL<sup>-1</sup>) seria obtida nas seguintes condições: concentração de NH<sub>4</sub>Cl e glicose a 0,00095 e 0,075g, respectivamente. Os demais componentes do meio de produção ficaram em seus níveis originais e o MgSO<sub>4</sub> em seu nível mínimo.

Para validação do modelo proposto, três ensaios adicionais foram montados, com as concentrações previstas pelo programa estatístico. Nestas condições, o micro-organismo produziu 295,72 U.mL<sup>-1</sup>, validando o modelo empregado para otimização da produção.

Diante do fato de que nenhum meio definido foi estabelecido para a melhor produção de proteases, incluindo as proteases coagulantes de leite, a escolha de um meio é passo importante, já que cada micro-organismo possui suas próprias condições especiais de produção enzimática máxima (Sharma et al., 2017).

A produção dessas enzimas é altamente influenciada por vários fatores que constituem o meio e o sistema fermentativo como um todo, como o tipo de fonte de carbono e nitrogênio, íons metálicos, pH, temperatura, volume de inóculo e tempo de incubação. Dessa forma, otimizar a condição de produção dessas enzimas é importante e pode ser realizada por métodos experimentais convencionais ou estatísticos (Esmaeili et al., 2015).

Poucos estudos empregaram planejamentos experimentais na produção e otimização de proteases coagulantes de leite por fungos filamentosos. Em um deles, Ayana et al. (2015) empregaram planejamento do tipo Plackett-Burman para triagem da influência dos constituintes do meio fermentativo na produção enzimática de *Mucor mucedo* KP736529 e realizaram um delineamento composto central para otimização da produção. No estudo, a otimização aumentou a produção em 6,12 vezes em relação a atividade inicial.

A maioria dos estudos avalia a produção de enzimas coagulantes por bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*. Ahmed et al. (2016) otimizaram a produção de enzimas coagulantes de leite por *Bacillus stearothermophilus*, utilizando como variáveis concentração de farelo de trigo, rotação e a adição de alguns suplementos naturais, como soja, sementes de

mostarda e açafrão, entre outros. Neste estudo, não utilizaram planejamentos como ferramentas estatísticas, dando preferência à experimentos convencionais, em que ensaios são realizados avaliando apenas uma variável por vez.

Para avaliação, o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e a glicose foram escolhidos porque fontes de carbono e nitrogênio são os principais componentes do meio que atuam como estimulantes essenciais para o crescimento de micro-organismos e produção enzimática; quanto à escolha do  $\text{MgSO}_4$ , sabe-se que alguns íons metálicos já foram relatados pela literatura como influenciadores da atividade enzimática, com indução na produção de proteases, por exemplo (Sharma et al., 2017).

A produção das enzimas coagulantes do leite foi influenciada pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e pela glicose, com efeitos negativos. Alguns trabalhos na literatura citam fontes inorgânicas de nitrogênio como pouco influenciadoras na produção de proteases, dando preferência a fontes orgânicas e complexas, como caseína, extrato de levedura, albumina, dentre outros (Chaud et al., 2016). Entretanto, em pesquisas anteriores relacionadas a este estudo, a farinha de soja utilizada no meio MS não apresentou significância para a produção (dados não mostrados).

A glicose, apesar de ser uma importante fonte de carbono, promoveu menor produção de enzimas coagulantes por *A. tamarii* URM6599 em suas maiores concentrações. Fato similar ocorreu na produção de protease alcalina por *B. licheniformis* (El Enshasy et al., 2008).

A metodologia da superfície de resposta é conhecida como excelente abordagem para melhorar a produção industrial de enzimas, pois ajuda a otimizar os meios de produção em pouco tempo e com menos esforço, em comparação com abordagens convencionais (Mishra, 2016). Neste estudo, um delineamento composto central possibilitou a otimização da produção. De modo geral, do ponto de vista econômico, todas as mudanças na composição do meio de produção foram benéficas, já que a quantidade de compostos utilizados foi diminuída e a produção enzimática aumentada.

### 3.5 Efeitos da temperatura e do pH na atividade coagulante do extrato enzimático e na estabilidade enzimática

A atividade coagulante de leite do extrato enzimático de *A. tamaritii* URM6599 foi máxima a 70 °C (Figura 5A). A menor atividade foi observada a 20 °C, apresentando 2% de atividade coagulante, quando comparada com o ensaio aos 70 °C. No geral, foi observado que à medida que a temperatura aumentava, a atividade coagulante também apresentou a mesma tendência. Somente aos 75 °C a atividade coagulante apresentou considerável declínio.

Resultado similar foi observado por Merheb-Dini et al. (2010), ao caracterizarem as enzimas coagulantes produzidas por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31; os autores encontraram atividade máxima coagulante a 70 °C. Em outro estudo, Merheb et al. (2007) encontraram a máxima atividade de protease produzida por *Thermoascus aurantiacus* aos 60 °C.

As enzimas coagulantes apresentaram uma maior estabilidade nas temperaturas mais baixas: de 20 a 50 °C a atividade coagulante ficou acima dos 80%. A partir dos 55 até 75 °C e enzima apresentou atividade que variaram de 78 a 44% de atividade (Figura 5A). Como observado, as enzimas produzidas por *A. tamaritii* URM6599 apresentaram excelente estabilidade à temperatura, principalmente em temperaturas mais baixas. Resultados similares foram encontrados por Merheb-Dini et al. (2010), entretanto diferente da enzima produzida neste estudo, a enzima de *T. indicae-seudaticae* N31 apresentou perda total da atividade a partir dos 60 °C, demonstrando ser uma enzima bastante termolábil.

A enzima obtida apresentou 80 e 58% de atividade residual nas temperaturas de 50 e 60 °C, respectivamente; já Silva et al. (2016b), observaram que a enzima produzida por *Rhizomucor miehei* apresentou atividade residual coagulante de 40% a 50 °C; a 60 °C a atividade residual apresentou cerca de 20%. Desta forma, é possível inferir que as enzimas coagulantes produzidas por *A. tamaritii* URM6599 são mais termoestáveis. De maneira geral, o

decréscimo da atividade coagulante em temperaturas mais altas, após incubação das enzimas por pelo menos 1 hora, é comum à maioria dos trabalhos.

O pH ótimo da atividade coagulante ocorreu em pH 5,5, em tampão acetato. Neste valor de pH a atividade apresentou aumento de 29,08% em relação ao ensaio descrito no item 2.7. Com aumento do valor do pH, a atividade coagulante diminuiu, exceto por um novo pico de atividade ótima em pH 8,0, com atividade de 66,85% (Figura 5B), que sugestionou a existência de uma outra protease coagulante no extrato bruto do micro-organismo.

As enzimas coagulantes apresentaram estabilidade frente aos diversos valores de pH. Entretanto, em pH mais ácidos apresentou as melhores atividades, com 90, 85 e 83% de atividade residual nos valores de pH 5,5; 6,0 e 6,5, respectivamente. Acima destes valores, a atividade coagulante apresentou declínio da atividade, até apresentar 63% no valor de pH 9 em uma hora de incubação.

Em relação ao valor ótimo de pH, Silva et al. (2016b) encontraram atividade máxima a pH 5,5 para enzima coagulante produzida por *Rhizomucor miehei*. Em outro estudo, também utilizando a espécie *A. tamaritii*, Benlounissi et al. (2014) também observaram máxima atividade em pH 5,5, respaldando a tendência observada neste estudo. O comportamento era o esperado, uma vez que proteases de origem fúngica geralmente exibem taxa catalítica maior em valores de pH ácidos (Merheb-Dini et al., 2010). Proteases coagulantes ácidas são interessantes para a indústria de queijos, uma vez que em alguns tipos o leite passa por acidificação, seja pela adição de ácido láctico, seja pela atuação de bactérias ácido-láticas que atuam promovendo a diminuição do pH inicial do leite. Curiosamente, a quimosina obtida de estômagos de bezerros apresenta a mesma tendência encontrada neste estudo, em que sua atividade coagulante é aumentada de forma considerável em valores ácidos e, em pH alcalinos, sua ação coagulante é diminuída (Richardson et al., 1967).

### 3.6 Efeitos da concentração de CaCl<sub>2</sub> e NaCl na atividade coagulante do extrato enzimático

A atividade coagulante do extrato enzimático apresentou atividade relativa de 100% a 0,04 M de CaCl<sub>2</sub>, considerada a melhor atividade enzimática perante todos os ensaios. Nos ensaios de 0 a 0,04 M de CaCl<sub>2</sub> foi observado aumento da atividade enzimática; após esta concentração, a atividade declinou até 22%, a 1 M. O efeito do NaCl também foi estudado e a enzima demonstrou ser estável às variadas concentrações do sal, com atividade relativa sempre acima dos 62%, mesmo na maior concentração estudada (1 M) (Figura 6).

Os íons cálcio e sódio possuem um importante papel no processo de fabricação de queijos, de modo que seus efeitos devem ser mensurados na atividade coagulante de leite. O cálcio é descrito como uma substância importante na formação do coágulo por criar condições isoelétricas favoráveis a ligação das micelas de caseína e o aumento da sua concentração leva a diminuição do tempo de coagulação (Arima et al., 1970; Merheb-Dini et al., 2010).

O sal, por sua vez, é importante sobretudo no processo de maturação de queijos, em especial no que se refere à atividade de água, controlando o crescimento e a atividade microbiana. Outros efeitos também lhe são atribuídos, como controle de atividade enzimática, mudanças no teor de umidade e nas mudanças físicas nas proteínas do queijo, por exemplo (Salehi et al., 2017).

Hang et al. (2016) trabalhando com *Paenibacillus* spp. BD3526 observaram que a máxima atividade coagulante foi obtida a 0,03 M de CaCl<sub>2</sub>, com diminuição gradual da atividade à medida que a concentração de cálcio aumentou, corroborando ao comportamento de coagulação das enzimas deste estudo. Em contrapartida, Ding et al. (2011) encontraram máxima atividade na concentração de 0,05 M de CaCl<sub>2</sub>.

As enzimas coagulantes de *A. tamarii* URM6599 apresentaram alta estabilidade frente ao NaCl. Sabendo-se da grande variedade de queijos que apresentam em seu processo variados

conteúdos de sal, a enzima obtida da cepa estudada é uma forte candidata na produção de queijos.

### 3.7 Efeitos de inibidores de proteases e íons sob a atividade coagulante do extrato enzimático

As enzimas presentes no extrato bruto enzimático de *A. tamaritii* URM6599 sofreram grande inibição frente ao PMSF a 10 mM, apresentando inibição de 92,28% de atividade coagulante do leite, quando comparado ao controle sem inibidores (Tabela 9). Além disso, o ensaio também proporcionou uma considerável inibição das enzimas pela pepstatina A; cerca de 44,14% da atividade original foi inibida. Por outro lado, o ácido iodoacético e o EDTA foram os inibidores que menos afetaram na atividade coagulante, apresentando 14,66 e 6,66% de inibição.

Como já discutido, no extrato enzimático obtido por *A. tamaritii* há possibilidade da existência de mais de uma enzima coagulante. A atividade de coagulação foi inibida de forma particular por PMSF e pepstatina A, substâncias inibidoras de serinos e aspárticas proteases, respectivamente.

Apesar da grande maioria das enzimas coagulantes de leite serem inibidas por pepstatina A, caracterizando-as em proteases aspárticas, deve-se notar que há relatos de outras enzimas coagulantes de outras classes. Como exemplos, tem-se proteases coagulantes de leite presentes no látex de *Euphorbia nivulia* pertencentes à classe das cisteíno proteases (Badgujar e Mahajan, 2013); outra enzima obtida através do látex de *Ficus religiosa*, a conhecida religiosina, é classificada como uma serino protease (Kumari et al., 2010).

Majumder et al. (2015) trabalharam com enzima coagulante de leite de *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091 e observaram inibição de coagulação frente ao EDTA, caracterizando-a dessa forma como uma metaloprotease, classe dependente de íons metálicos para atuação enzimática.

De modo geral, no efeito dos íons sob a atividade coagulante, a atividade relativa se manteve acima dos 62,88%, valor encontrado quando do teste com o íon  $Zn^{2+}$  e considerada a maior inibição encontrada no ensaio (37,12% de inibição). Os íons  $Ba^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  potencializaram a ação coagulante das enzimas, com aumento da atividade em 11,49 e 1,01%, respectivamente. Ademais, os outros íons apresentaram inibição da atividade coagulante em níveis que variaram de 3,89 a 24,46% (Tabela 9).

Os íons podem interagir com enzimas através de atração eletrostática. Essa interação, por sua vez, pode alterar a conformação da proteína e modificar a orientação da ligação da enzima com o substrato, o que aumenta ou dificulta a catálise enzimática. Além disso, os íons podem se ligar a resíduos reativos localizados no sítio ativo da enzima, podendo bloquear ou agir como cofatores na ação enzimática; portanto a avaliação da atuação destes íons na atividade enzimática é essencial (Silva et al., 2017).

Além do  $Ca^{2+}$ , outros íons divalentes também são conhecidos por causarem coagulação do leite, como o  $Mg^{2+}$  (Narwal et al., 2016), avaliado em nosso estudo. Os íons que mais inibiram a atividade coagulante foram o  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$  no presente trabalho. Com resultados similares ao encontrados neste estudo, Silva et al. (2017), ao trabalharem com enzima coagulante de *Phanerochaete chrysosporium* também observaram esta tendência para os íons  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ; todavia, a 5 mM a atividade da enzima coagulante foi reduzida para 32% no ensaio com  $Cu^{2+}$  e cerca de 80% no ensaio com  $Co^{2+}$ , apresentando valores de atividade mais baixos que os nossos, avaliados a uma concentração de 10 mM.

#### 4. CONCLUSÃO

Enzimas coagulantes de leite foram obtidas através do micro-organismo *A. tamarii* URM6599 e, através da utilização de planejamentos estatísticos, a produção enzimática pelo micro-organismo foi otimizada para uma atividade coagulante de 295,72 U.mL<sup>-1</sup>. São

necessárias pesquisas mais aprofundadas quanto à utilização segura do micro-organismo, entretanto o extrato enzimático otimizado apresentou baixa toxicidade e o micro-organismo não produziu as micotoxinas estudadas nas metodologias empregadas no presente artigo. Além disso, o extrato enzimático apresentou características bioquímicas interessantes para aplicação na produção de queijos, com maior atividade coagulante em valores de pH mais ácidos (pH 5,5), temperatura ótima de 70 °C e estabilidades frente ao pH, temperatura, íons, NaCl e CaCl<sub>2</sub>. Dessa forma, o *A. tamarii* URM 6599 pode ser considerado um excelente candidato à produtor de enzimas coagulantes de leite.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), por meio do processo IBPG-1413-5.07/13, e estrutural da UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco) e do CENLAG (Centro Laboratorial Multiusuário de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns).

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahmed, S.A., Wehaidy, H.R., Ibrahim, O.A., Hasan, S.A., El-Hofi, M.A., Ahmed, A., Wehaidy, R., 2016. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 241–249.
- Amer, A.E.A., Hashem, M.I., Amer, M.E., Gomaa, A.M., 2015. Using sweet whey for production of milk clotting enzyme by *Mucor miehei* NRRL 3420 in production of white soft cheese. *Middle East J. Appl. Sci.* 5, 1068–1081.
- Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S., 1970. Milk-Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Methods Enzymol.* 546, 446–459.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Marin, S., Ramos, A., 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiol.* 38, 276–283.
- Ayana, I.A.A.A., Ibrahim, A.E., Saber, W.I.A., 2015. Statistical optimization of milk clotting enzyme biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 and its further application in cheese production. *Int. J. Dairy Sci.* 10, 61–76.

- Badgujar, S.B., Mahajan, R.T., 2013. Peptide mass fingerprinting and N-terminal amino acid sequencing of glycosylated cysteine protease of *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. *J. Amino Acids* 2013, 1–6.
- Benlounissi, A., Aïcha, M.-M., Loïc, J.B., Christophe, A.M., 2014. Identification and characterization of milk-clotting proteases produced by two species of mold. *Afr. J. Biotechnol.* 13, 1275–1280.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516.
- Bhat, R., Rai, R.V., Karim, A.A., 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 57–81.
- Chaud, L.C.S., Lario, L.D., Bonugli-Santos, R.C., Sette, L.D., Pessoa Junior, A., Felipe, M. das G. de A., 2016. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnol.* 33, 807–814.
- Chkuaseli, A., Khutsishvili-Maisuradze, M., Chagelishvili, A., Natsvaladze, K., Lashkarashvili, T., Chagelishvili, G., Maisuradze, N., 2016. Application of new mycotoxin adsorbent-bentonite clay “Askangel” in poultry feed. *Ann. Agrar. Sci.* 14, 295–298.
- Ding, Z., Liu, S., Gu, Z., Zhang, L., Zhang, K., Shi, G., 2011. Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 9370–9378.
- El Enshasy, H., Abuoul-Enein, Helmy, El Azaly, Y., 2008. Optimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scales. *Aust. J Basic Appl. Sci.* 2, 583–593.
- El-Tanboly, E.S., El-Hofi, M., Youssef, Y.B., El-Desoki, W., Ismail, A., 2013. Utilization of salt whey from egyptian ras (cephalotyre) cheese in microbial milk clotting enzymes production. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 12, 9–19.
- Esmaeili, M., Yolmeh, M., Shakerardakani, A., Golivari, H., 2015. A central composite design for the optimizing lipase and protease production from *Bacillus subtilis* PTCC 1720. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 349–354.
- Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Rodriguez-Rama, J.L., Barros-Velazquez, J., Miguel, T.D., Sanchez-Perez, A., Villa, T.G., 2014. Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent Adv. DNA Gene Seq.* 8, 44–55.
- Hang, F., Wang, Q., Hong, Q., Liu, P., Wu, Z., Liu, Z., Zhang, H., Chen, W., 2016. Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. *Int. J. Biol. Macromol.* 85, 547–554.
- Hepsag, F., Golge, O., Kabak, B., 2014. Quantitation of aflatoxins in pistachios and groundnuts using HPLC-FLD method. *Food Control* 38, 75–81.
- Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Hanif, U., Zuber, M., Jinap, S., 2016. The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; And evaluation of dietary intake. *Food Chem.* 210, 135–140.
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* 64, 14–33.
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., Batish, V.K., 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 243–258.

- Kumar, S., Shekhar, M., Ali, K.A., Sharma, P., 2007. A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain. *Indian Phytopathol.* 1, 31–34.
- Kumari, M., Sharma, A., Jagannadham, M.V., 2010. Decolorization of crude latex by activated charcoal, purification and physico-chemical characterization of religiosin, a milk-clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8027–8034.
- Lai, X., Zhang, H., Liu, R., Liu, C., 2015. Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 176–180.
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A.M., Manfra, L., 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecol. Indic.* 69, 35–49.
- Lin, M.T., Dianese, J.C., 1976. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology.* 66, 1466-1469.
- Luchese, R.H., Harrigan, W.F., 1990. Growth of, and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and at different initial pH values. *J. Food Prot.* 69, 512–519.
- Majumder, R., Banik, S.P., Khowala, S., 2015. Purification and characterisation of  $\kappa$ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. *Food Chem.* 173, 441–448.
- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Da-Silva, R., 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem.* 104, 127–131.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., da Silva, R., 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chem.* 120, 87–93.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., McLaughlin, J., 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31–34.
- Mishra, V.K., 2016. Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 87–94.
- Moradi, M., Fani, S.R., Dargahi, R., Moghadam, M.M., 2017. A simple procedure to evaluate competitiveness of toxigenic and atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* in solid and liquid media. *J Chem Health Risks.* 7, 105–112.
- Narwal, R.K., Bhushan, B., Pal, A., Panwar, A., Malhotra, S., 2016. Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 652–660.
- Nasir, M.S., Jolley, M.E., 2002. Development of a fluorescence polarization assay for the determination of aflatoxins in grains. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3116–3121.
- Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., Lima Filho, J.L., 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60, 115–122.
- Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 3–10.

- Richardson, G.H., Nelson, J.H., Lubnow, R.E., Schwarberg, R.L., 1967. Rennin-like enzyme from *Mucor pusillus* for cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* 50, 1066–1072.
- Saito, M., Machida, S., 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40, 205–208.
- Salehi, M., Aghamaali, M.R., Sajedi, R.H., Asghari, S.M., Jorjani, E., 2017. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *Int. J. Biol. Macromol.* 98, 847–854.
- Shah, M.A., Mir, S.A., Paray, M.A., 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Sci. Technol.* 94, 5–16.
- Shamtsyan, M., Dmitriyeva, T., Kolesnikov, B., Denisova, N., 2014. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *LWT - Food Sci. Technol.* 58, 343–347.
- Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15, 115–126.
- Silva, O.S., Oliveira, R.L., Souza-Motta, C.M., Porto, A.L.F., Porto, T.S., 2016a. Novel protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. *Adv. Enzyme Res.* 04, 125–143.
- Silva, R.R., de Oliveira, L.C.G., Juliano, M.A., Juliano, L., de Oliveira, A.H.C., Rosa, J.C., Cabral, H., 2017. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Food Chem.* 225, 45–54.
- Silva, R.R., Souto, T.B., Oliveira, T.B., Oliveira, L.C.G., Karcher, D., Juliano, M.A., Juliano, L., Oliveira, A.H.C., Rodrigues, A., Rosa, J.C., Cabral, H., 2016b. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1059–1069.
- Wang, B., Han, X., Bai, Y., Lin, Z., Qiu, M., Nie, X., Wang, S., Zhang, F., Zhuang, Z., Yuan, J., Wang, S., 2017. Effects of nitrogen metabolism on growth and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *J. Hazard. Mater.* 324, 691–700.
- Wehaidy, H.R., Abdel-Naby, M.A., Sousha, W.G., El Mallah, M.I.Y., Shawky, M.M. 2016. Optimization of the production and characterization of milk-clotting enzyme from *Bacillus subtilis* isolated from marine sponge. *Egypt. Pharm. J.* 15, 158–166.

## TABELAS

**Tabela 1.** Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial completo  $2^3$  para produção de proteases coagulantes de leite por *A. tamarii* URM6599.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
NH <sub>4</sub> Cl (g.25 mL <sup>-1</sup> )	0,005	0,025	0,045
MgSO <sub>4</sub> (g.25 mL <sup>-1</sup> )	0,005	0,015	0,025
Glicose (g.25 mL <sup>-1</sup> )	0,1	0,25	0,40

**Tabela 2.** Valores codificados e reais utilizados no delineamento central composto para produção de proteases coagulantes de leite por *A. tamaritii* URM6599.

<b>Variáveis (g.25 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Níveis</b>				
	<b>-1,414</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>+1,414</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	0,000	0,0003	0,001	0,0017	0,002
<b>Glicose</b>	0,060	0,066	0,080	0,094	0,1

**Tabela 3.** Matriz correspondente do planejamento fatorial  $2^3$  com os resultados de atividade coagulante ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) do extrato enzimático bruto do *A. tamaritii* URM6599.

Ensaio	Variáveis independentes ( $\text{g.25 mL}^{-1}$ )			Variável resposta
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{MgSO}_4$	Glicose	AC* ( $\text{U.mL}^{-1}$ )
1	0,005 (-1)	0,005 (-1)	0,1 (-1)	$255,32 \pm 0,00$
2	0,045 (+1)	0,005 (-1)	0,1 (-1)	$28,99 \pm 0,40$
3	0,005 (-1)	0,025 (+1)	0,1 (-1)	$263,74 \pm 0,00$
4	0,045 (+1)	0,025 (+1)	0,1 (-1)	$88,56 \pm 0,00$
5	0,005 (-1)	0,005 (-1)	0,40 (+1)	$65,57 \pm 0,00$
6	0,045 (+1)	0,005 (-1)	0,40 (+1)	$22,42 \pm 0,16$
7	0,005 (-1)	0,025 (+1)	0,40 (+1)	$127,67 \pm 1,92$
8	0,045 (+1)	0,025 (+1)	0,40 (+1)	$12,16 \pm 0,51$
9	0,025 (0)	0,015 (0)	0,25 (0)	$91,95 \pm 0,00$
10	0,025 (0)	0,015 (0)	0,25 (0)	$100,42 \pm 0,59$
11	0,025 (0)	0,015 (0)	0,25 (0)	$113,75 \pm 0,76$

\*AC: Atividade coagulante

**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) para produção de proteases coagulante de leite por *A. tamaritii* URM6599 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>Fcal</b>	<b>Ftab</b>
<b>Regressão</b>	69367,22	6	11561,20	20,76	6,16
<b>Resíduo</b>	2227,42	4	556,86		
<b>Falta de ajuste</b>	1986,02	2	993,01	8,23	19,00
<b>Puro erro</b>	241,40	2	120,70		
<b>Total</b>	71594,64	10			

Fcal: F calculado; Ftab: F tabelado.

R<sup>2</sup> = 0,9658

**Tabela 5.** Estimativa dos efeitos das variáveis na produção de proteases coagulantes de leite por *A. tamaritii* URM6599 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>Variáveis</b>	<b>Efeitos</b>	<b>T</b>	<b>p-valor</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	-140,044	-18,0273	0,003063*
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	29,957	3,8562	0,061146
<b>Glicose</b>	-102,195	-13,1551	0,005729*
<b>1 por 2</b>	-5,302	-0,6825	0,565363
<b>1 por 3</b>	60,709	7,8148	0,015983*
<b>2 por 3</b>	-4,038	-0,5198	0,654997

\* Estatisticamente significativo a 95%.

**Tabela 6.** Matriz do delineamento composto central com os resultados de atividade coagulante (U.mL<sup>-1</sup>) do extrato enzimático bruto produzido por *A. tamaritii* URM6599.

Ensaio	Variáveis independentes		Variável resposta	
	NH <sub>4</sub> Cl (g.25 mL <sup>-1</sup> )	Glicose (g.25 mL <sup>-1</sup> )	Experimental	Predito
<b>1</b>	0,0003	0,066	280,39 ± 9,89	271,09
<b>2</b>	0,0017	0,066	266,67 ± 0,00	263,45
<b>3</b>	0,0003	0,094	222,22 ± 0,00	230,47
<b>4</b>	0,0017	0,094	218,18 ± 0,00	234,51
<b>5</b>	0,0000	0,080	265,69 ± 1,69	267,9
<b>6</b>	0,0020	0,080	275,86 ± 0,00	266,76
<b>7</b>	0,0010	0,060	248,76 ± 0,00	257,6
<b>8</b>	0,0010	0,100	222,22 ± 0,00	206,49
<b>9</b>	0,0010	0,080	289,16 ± 0,00	284,18
<b>10</b>	0,0010	0,080	280,19 ± 3,75	284,18
<b>11</b>	0,0010	0,080	283,47 ± 1,94	284,18

\*AC: Atividade coagulante

**Tabela 7.** Estimativa dos efeitos das variáveis na produção de proteases coagulantes de leite por *A. tamaritii* URM6599 de acordo com o delineamento composto central.

<b>Variáveis</b>	<b>Efeitos</b>	<b><i>t</i></b>	<b><i>p</i>-valor</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl (L)</b>	-0,8000	-0,2507	0,825482
<b>NH<sub>4</sub>Cl (Q)</b>	-16,5101	-4,3839	0,048294*
<b>Glicose (L)</b>	-35,7769	-11,2089	0,007865*
<b>Glicose (Q)</b>	-51,0903	-13,5661	0,005390*
<b>NH<sub>4</sub>Cl (L) x Glicose (L)</b>	4,8419	1,0672	0,397629

\* Estatisticamente significativo a 95%.

**Tabela 8.** Análise de variância (ANOVA) para produção de proteases coagulante de leite por *A. tamaritii* URM6599 de acordo com o delineamento composto central.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>Fcal</b>	<b>Ftab</b>
<b>Regressão</b>	6794,54	5	1358,90	14,06	5,05
<b>Resíduo</b>	483,28	5	96,66		
<b>Falta de ajuste</b>	836,02	3	278,67	13,54	19,16
<b>Puro erro</b>	41,17	2	20,58		
<b>Total</b>	7277,82	10			

Fcal: F calculado; Ftab: F tabelado.

$R^2 = 0,8794$

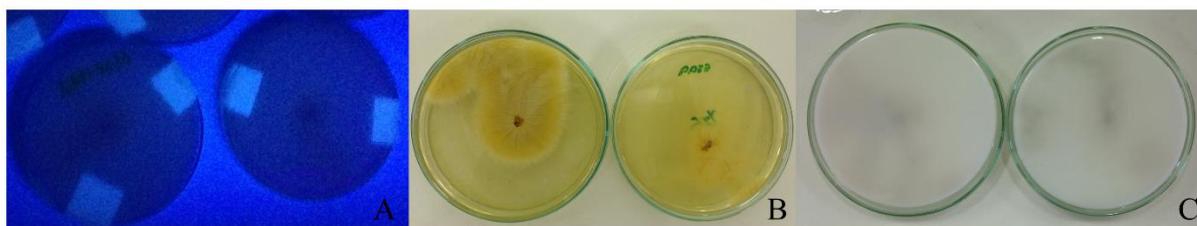
**Tabela 9.** Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade coagulante do extrato enzimático produzido por *Aspergillus tamaritii* URM6599.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (mM)</b>	<b>*AC Relativa (%)</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>Controle</b>	-	100 ± 0,00	-
<b>Ácido Iodoacético</b>	10	85,34 ± 5,45	14,66
<b>EDTA</b>	10	93,34 ± 0,55	6,66
<b>pepstatina A</b>	0,1	55,86 ± 0,00	44,14
<b>PMSF</b>	10	5,72 ± 0,00	94,28
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	10	111,49 ± 0,00	-
<b>CoSO<sub>4</sub></b>	10	83,89 ± 3,67	16,11
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	10	75,54 ± 0,00	24,46
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	10	93,83 ± 0,57	6,17
<b>KCl</b>	10	89,82 ± 0,00	10,18
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	10	101,01 ± 0,00	-
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	10	96,11 ± 0,00	3,89
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	10	62,88 ± 0,13	37,12

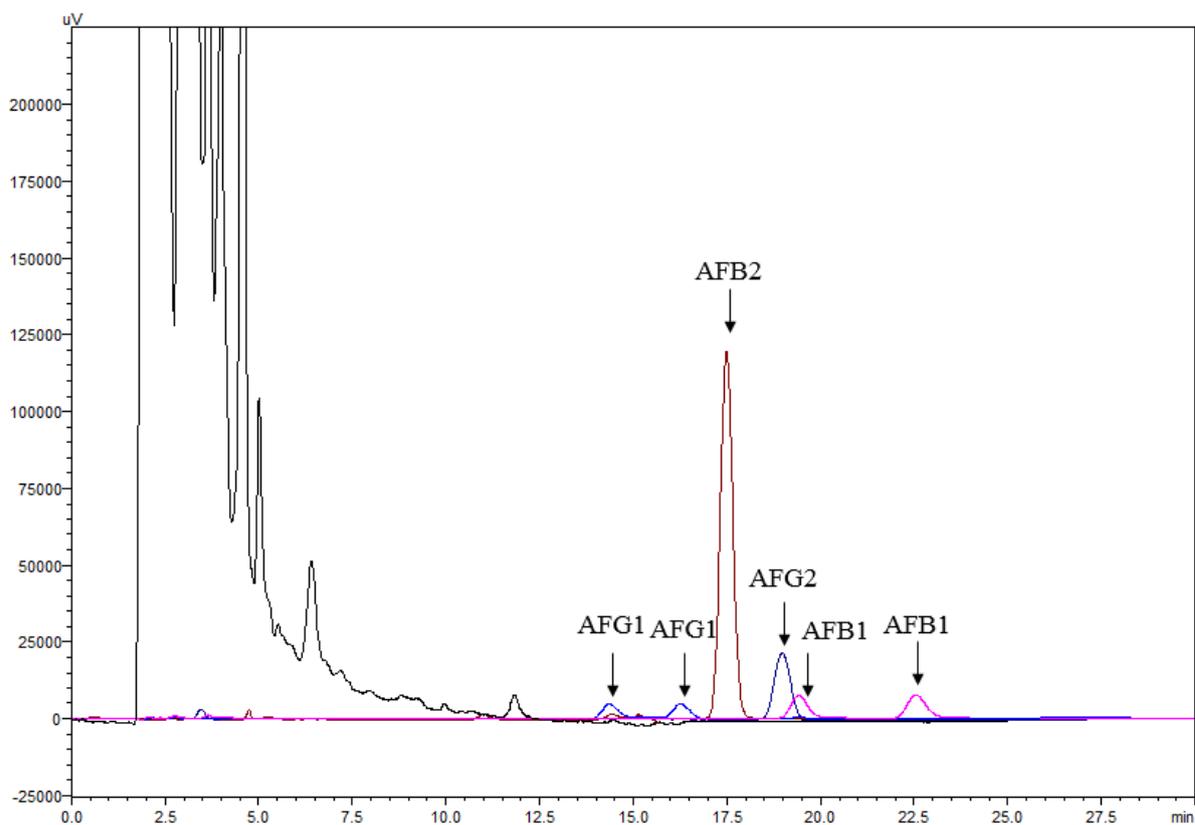
\*AC: Atividade coagulante

## FIGURAS

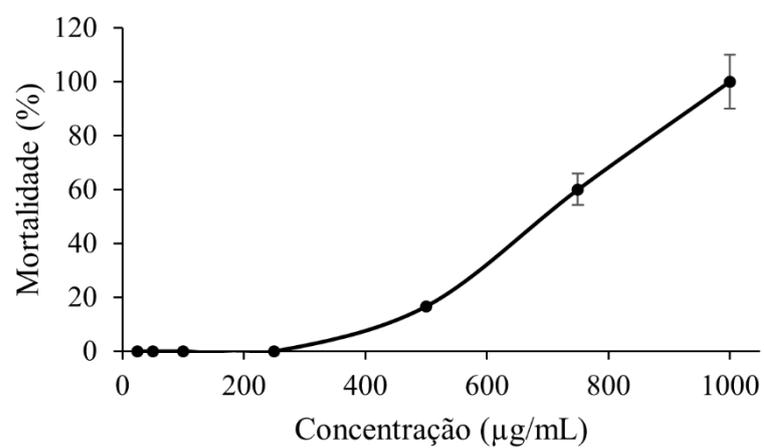
**Figura 1.** Teste de detecção da produção de aflatoxinas de *A. tamarii* URM6599. Meio Ágar Coco sob luz ultravioleta a 365 nm (A); Teste de vapor amônio em Meio Extrato de Levedura (B) e Meio Ágar Coco (C) após sete dias de incubação.



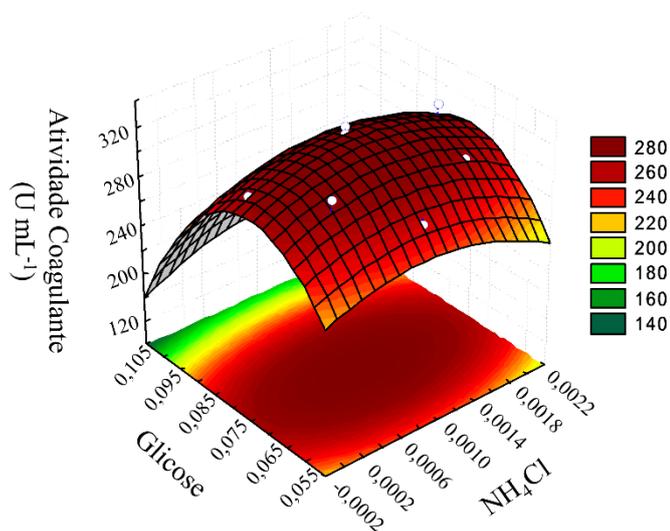
**Figura 2.** Detecção de aflatoxinas AFB1 (cor rosa), AFB2 (cor marrom), AFG1 (cor azul claro) e AFG2 (cor azul escuro) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato enzimático bruto de *A. tamarii* URM6599 (cor preta).



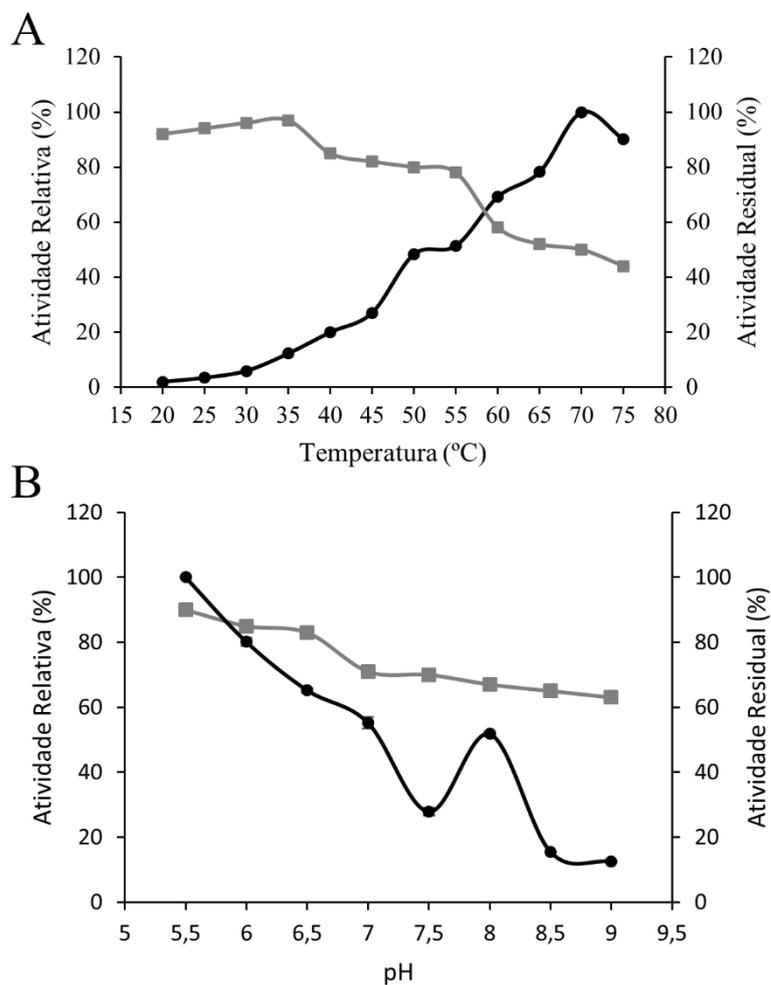
**Figura 3.** Bioensaio com *Artemia salina* para determinação do efeito citotóxico do extrato bruto enzimático produzido por *A. tamaritii* URM6599.



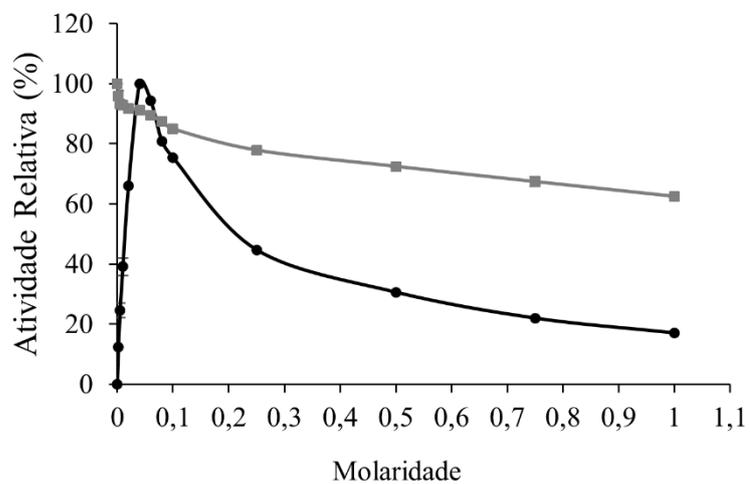
**Figura 4.** Superfície de resposta da produção de proteases coagulantes de leite por *A. tamaritii* URM6599 demonstrando a interação entre as variáveis  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e glicose.



**Figura 5.** Propriedades físico-químicas de coagulação do leite das proteases produzidas por *A. tamaritii* URM6599. Atividade ótima (•) e estabilidade (▪) a temperatura (A) e ao pH (B).



**Figura 6.** Efeito da concentração de  $\text{CaCl}_2$  (•) e  $\text{NaCl}$  (■) na coagulação do leite pelas proteases produzidas por *A. tamarii* URM6599.



# CAPÍTULO II

**Propriedades bioativas de peptídeos de queijos Minas Frescal caprinos produzidos com enzimas coagulantes de leite de *Aspergillus tamarii* URM6599 e de fonte comercial: um estudo comparativo**

A ser submetido na:

Journal of Functional Foods



<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-functional-foods/>

Propriedades bioativas de peptídeos de queijos Minas Frescal caprinos produzidos com enzimas coagulantes de leite de *Aspergillus tamaris* URM6599 e de fonte comercial: um estudo comparativo

Alana Emilia Soares de França Queiroz<sup>a</sup>; Anna Carolina da Silva<sup>a</sup>; Wellington Leal dos Santos<sup>a</sup>; Elizabel Oliveira Silva de Melo<sup>b</sup>; João Tiago Correia de Oliveira<sup>c</sup>; José Erick Galindo Gomes<sup>d</sup>; Cristina Maria de Souza-Motta<sup>e</sup>; Keila Aparecida Moreira<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup>Centro Tecnológico Instituto de Laticínios do Agreste, Garanhuns, PE, Brasil.

<sup>c</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil.

<sup>d</sup>Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>e</sup>Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

\* Autor para correspondência: Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil.

Telefone: (+5587) 37645581;

FAX: 37645500;

e-mail: [moreirakeila@hotmail.com](mailto:moreirakeila@hotmail.com)

## RESUMO

O alto crescimento da demanda de consumo por produtos alimentícios saudáveis e nutricionais incentiva a indústria de alimentos a realizar melhorias no desenvolvimento de alimentos naturais e funcionais. Dessa forma, com este estudo objetivou-se explorar o uso de um novo coagulante microbiano de leite obtido a partir de *Aspergillus tamarii* URM6599 na produção de queijo Minas Frescal caprino. Após produção dos queijos (queijo com extrato enzimático bruto de *A. tamarii* URM6599 e queijo com coagulante comercial), peptídeos foram extraídos de sua composição através de ultrafiltração com membranas de corte < 3 kDa e < 10 kDa e avaliados quanto à atividade antioxidante (capturas dos radicais ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e quelante de Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup>), anti-hipertensiva e antimicrobiana, frente a quatro micro-organismos, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Na avaliação dos resultados, os peptídeos de ambos os queijos apresentaram atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana. Diante do exposto, observa-se que o novo coagulante demonstra potencial de uso na elaboração de queijo Minas Frescal caprino funcional. Ademais, os resultados demonstram que o queijo brasileiro Minas Frescal produzido com leite de cabra é uma excelente fonte de peptídeos biologicamente ativos.

**Palavras-chave:** antimicrobiano, antioxidante, leite caprino, Minas Frescal, peptídeos bioativos

## 1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, diversas fontes de informação midiáticas revelam e enfatizam a relação entre nutrição e saúde e a necessidade de adoção de bons hábitos alimentares, com a inclusão de alimentos saudáveis na dieta (Reis et al., 2017). Alguns destes alimentos são chamados de

funcionais por apresentarem efeitos potencialmente positivos sobre o organismo, para além da nutrição básica, pois promovem melhores condições de saúde através da redução e prevenção de uma série de patologias (Granato et al., 2017).

Como o consumo de alimentos funcionais pela população pode ajudar no aumento do bem-estar populacional, a elaboração destes pode ser atrativa, principalmente com o aumento dos custos com cuidados de saúde, bem como uma maior expectativa de vida populacional a nível mundial (Villaño, Gironés-Vilapana, García-Viguera, & Moreno, 2016).

Encontrados nos hábitos alimentares de indivíduos em todo o mundo, o leite e seus derivados, como o queijo, são exemplos de alimentos ditos funcionais, por apresentarem uma série de atividades biológicas importantes. Em relação ao queijo, alguns estudos já foram conduzidos com o intuito de avaliar sua atividade bioativa, principalmente no que concerne àquela derivada dos peptídeos biologicamente ativos encontrados em sua composição (Pepe et al., 2016; Silva et al., 2012; Stuknyte et al., 2015; Tenore et al., 2015; Timón et al., 2014).

Em um deles, Silva et al. (2012) avaliaram a presença de atividade bioativa em queijos tipo Coalho, tipicamente brasileiro e produzido com a utilização de enzimas coagulantes comerciais. Neste estudo, os peptídeos extraídos das amostras foram avaliados e apresentaram atividades antimicrobiana, ligante de zinco e antioxidante.

Santos, Nascimento, Queiroz, Medeiros, & Moreira (2017) avaliaram também as propriedades bioativas de queijo Minas Frescal produzidos com leite bovino e encontraram atividades antimicrobiana e antioxidante; a amostra estudada pelos autores foi elaborada também com a utilização de enzimas coagulantes comerciais.

Com a estimativa de aumento do consumo global de queijos de cerca de 13,5% entre 2016 e 2025 (OECD/FAO, 2016), a tendência de pesquisadores de alimentos e produtores de queijo é direcionar ações à melhoria da qualidade dos produtos já existentes ou na formulação de produtos inovadores (Lamichhane et al., 2017).

É sabido que a maioria dos estudos referentes à bioatividade de queijos avaliaram a performance de queijos comerciais, elaborados com a utilização de enzimas coagulantes comerciais. Em contrapartida, até agora nenhum trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito bioativo em queijos quando do emprego de novas enzimas coagulantes microbianas.

Dessa forma, o principal objetivo do presente estudo foi explorar o uso de um novo coagulante microbiano de leite, obtido por *Aspergillus tamaris* URM6599, na produção de queijo Minas Frescal caprino quanto a propriedades bioativas, comparando-o a um coagulante comercial comumente utilizado na fabricação de queijos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### **2.1 Obtenção e preparo do extrato enzimático de *Aspergillus tamaris* URM6599 para produção de queijo**

O fungo filamentosso *A. tamaris* URM6599 foi obtido da Coleção de Culturas – Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco. Em estudos anteriores, este micro-organismo demonstrou potencial na produção de enzimas coagulantes. As enzimas coagulantes foram obtidas através de fermentação submersa, utilizando meio de produção Meio Soja (MS) (Porto, Campos-Takaki, & Lima-Filho, 1996) com modificações em sua composição: filtrado de farinha de soja a 6%, cloreto de amônio a 0,0038%, glicose a 0,3% e MgSO<sub>4</sub> a 0,02%.

A produção enzimática ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, contendo 25 mL do meio MS modificado. A fermentação transcorreu por 120 horas em incubadora refrigerada, a 110 rpm e 30 °C. Após o tempo estabelecido, o extrato enzimático rico em enzimas coagulantes foi obtido por interrupção da fermentação por filtração do conteúdo fermentado.

Testes preliminares foram conduzidos para otimizar a quantidade de extrato enzimático suficiente para conseguir coagulação do leite em 30 minutos, tempo de referência para coagulação da quimosina (dados não apresentados). A quantidade de 1000 mL do extrato (com atividade coagulante de 293,32 U.mL<sup>-1</sup>) foram liofilizados e posteriormente ressuspensos em 250 mL de água ultrapura, com objetivo de concentrar as enzimas coagulantes para a fabricação do queijo.

## **2.2 Produção dos queijos Minas Frescal**

Os queijos foram produzidos com 20 litros de leite caprino obtidos de um rebanho de animais da raça Saanen, localizado no município de Alagoinha – PE. Os animais estavam com aproximadamente 30 dias de lactação. Previamente à produção dos queijos, o leite foi pasteurizado por 30 minutos a 65 °C; quando a temperatura do leite decresceu a 35 °C, foram adicionados ao leite cloreto de cálcio (0,03%) e 5 mL ácido láctico industrial (85% de pureza). Após à adição dos componentes, 10 litros de leite foram destinados à fabricação do queijo com coagulante comercial (Ha-La<sup>®</sup>, Chr. Hansen, São Paulo, Brasil), na quantidade recomendada pelo fabricante para coagulação do leite em 30 minutos; os 10 litros restantes foram destinados à fabricação do queijo com o coagulante produzido a partir de *A. tamaris* URM6599, na proporção de 25 mL.L<sup>-1</sup> de leite caprino.

Transcorridos 30 minutos do processo de coagulação para ambos tratamentos, a coalhada foi cortada em cubos de 1,5–2,0 cm<sup>3</sup>, posteriormente submetidos a lenta e contínua mexedura por 20 minutos. A coalhada cortada foi deixada em repouso por mais 15 minutos para, finalmente, ser dessorada e colocada em moldes plásticos. Foram realizadas três viragens da coalhada com intervalos de 1 hora cada, até que os queijos foram considerados prontos e armazenados sob refrigeração ( $\pm 8$  °C) por 24 horas até determinação do rendimento dos queijos.

### **2.3 Determinação do rendimento bruto dos queijos**

Após 24 horas da produção dos queijos, o rendimento dos queijos foi determinado de duas maneiras; a primeira, seguindo metodologia de Frau, Font de Valdez, & Pece (2014), de acordo com a equação 1:

$$Rendimento = \frac{Peso\ do\ queijo\ (Kg)}{Peso\ do\ leite\ (Kg)} \times 100$$

(Equação 1).

A segunda metodologia, também conhecida por rendimento econômico, foi realizada considerando o volume de leite gasto para se fabricar um quilo (kg) de queijo (Furtado, 2017).

### **2.4 Extração dos peptídeos dos queijos**

A extração dos peptídeos dos queijos seguiu metodologia proposta por Silva et al. (2012) com modificações. Inicialmente, 500 gramas de cada queijo foram homogeneizados com água ultrapura (1:2) em liquidificador doméstico por cinco minutos, seguido de agitação do conteúdo em agitador mecânico por 10 minutos a 1000 rpm. O conteúdo foi centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo os peptídeos solúveis em água foi coletado e o precipitado descartado. O processo de centrifugação foi repetido mais duas vezes nas mesmas condições, até obtenção de sobrenadante livre de precipitado. Por último, foi realizada filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore®) e as soluções de peptídeos solúveis em água foram congeladas e armazenadas até momento do uso.

### **2.5 Ultrafiltração e preparação dos peptídeos para ensaios *in vitro***

As soluções de peptídeos obtidas dos dois tipos de queijo passaram por processo de ultrafiltração, que utilizou membrana de corte Amicon® Ultra-15 de 10 e 3 kDa (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irlanda). Os permeados de cada ultrafiltração foram congelados,

liofilizados e posteriormente ressuspensos em água ultrapura em oito concentrações que variaram de 0,39 a 50 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 2.6 Atividades biológicas *in vitro*

### 2.6.1 Atividade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>

A atividade sequestradora do radical ABTS<sup>•+</sup> dos peptídeos de diferentes massas moleculares foi determinada de acordo com metodologia proposta por Re et al. (1999), com modificações. Neste ensaio, o radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado a partir de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) a 7 mM e persulfato de potássio a 2,45 mM, seguido de incubação ao abrigo de luz por 16 horas a 30 °C. Previamente ao uso, a solução do radical ABTS<sup>•+</sup> foi ajustada para uma absorbância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm, por diluição com tampão fosfato-salino (PBS), 100 mM, pH 7,4, utilizando espectrofotômetro Libra S22 (Biochrom®, Áustria). Para a reação, 50 µL dos peptídeos foram misturados com 950 µL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Um controle negativo foi preparado, com a utilização de tampão fosfato-salino ao invés da amostra ultrafiltrada. Os ensaios foram incubados a 30 °C por seis minutos e lidos a 734 nm. Todos os ensaios ocorreram em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical (%), de acordo com a Equação 2:

$$\textit{Atividade antioxidante} (\%) = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

(Equação 2)

Onde, A<sub>controle</sub> representou a absorbância do controle negativo, utilizando tampão no lugar da amostra e A<sub>amostra</sub> foi a absorbância dos ensaios contendo os peptídeos.

### 2.6.2 Atividade de sequestro do radical DPPH\*

A atividade sequestradora do radical DPPH\* dos peptídeos foi determinada de acordo com metodologia proposta por Li, Jiang, Zhang, Mu, & Liu (2008) com modificações. A reação consistiu na mistura reacional de 100 µL dos peptídeos e 100 µL do radical DPPH\*, este solubilizado em metanol a 95% previamente ao uso, a 0,1 mM. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno (Corning®), e incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Um controle negativo também foi realizado, com a substituição da amostra por água destilada. A absorbância dos ensaios foi mensurada a 517 nm em leitora de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) e a atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de sequestro do radical DPPH (%), de acordo com Equação 3

$$\textit{Atividade antioxidante} (\%) = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

(Equação 3)

Onde,  $A_{\text{controle}}$  representou a absorbância do controle negativo, utilizando água no lugar da amostra e  $A_{\text{amostra}}$  foi a absorbância dos ensaios contendo os peptídeos.

### 2.6.3 Atividade de sequestro do radical hidroxila (OH\*)

A atividade de sequestro do radical OH\* foi realizada com base na metodologia proposta por Pownall, Udenigwe, & Aluko (2010). Em placas de 96 poços de fundo plano de poliestireno, 50 µL dos peptídeos foram incubados a 50 µL de 1,10-fenantrolina a 3 mM (solubilizado em tampão fosfato de sódio pH 7,4 a 0,1 M) e 50 µL de FeSO<sub>4</sub> a 3 mM (solubilizado em água destilada). Para início da reação, 50 µL de solução aquosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,01% foram adicionados aos ensaios. Para efeito do cálculo, mais dois ensaios foram

realizados: um controle negativo, sem amostras ultrafiltradas e um branco, sem amostra e sem peróxido de hidrogênio. A mistura reacional foi protegida da luz e incubada a 37 °C por uma hora, sob agitação. A absorbância dos ensaios foi mensurada a 536 nm em leitora de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) e a atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de sequestro do radical OH• (%), de acordo com a Equação 4:

$$\textit{Atividade antioxidante} (\%) = \left( \frac{A_{\textit{amostra}} - A_{\textit{controle}}}{A_{\textit{branco}} - A_{\textit{controle}}} \right) \times 100$$

(Equação 4)

Onde,  $A_{\textit{amostra}}$  representou a absorbância do ensaio completo com os peptídeos;  $A_{\textit{controle}}$  representou a absorbância do ensaio contendo 1,10-fenantrolina,  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com tampão fosfato de sódio no lugar do peptídeo; e  $A_{\textit{branco}}$  representou a absorbância do ensaio contendo 1,10-fenantrolina e  $\text{FeSO}_4$ , com tampão no lugar da amostra e água no lugar do peróxido de hidrogênio.

#### 2.6.4 Atividade de sequestro do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

A atividade sequestrante do radical  $\text{O}_2^-$  foi avaliada seguindo metodologia proposta por Pownall et al. (2010). Em placas de 96 poços de fundo plano de poliestireno, 80  $\mu\text{L}$  dos peptídeos foram adicionados a 80  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (50 mM a pH 8,3) contendo 1 mM de EDTA, sob proteção da luz. Imediatamente 40  $\mu\text{L}$  de pirogalol a 1,5 mM (dissolvido em HCl a 10 mM) foram adicionados aos ensaios. A absorbância dos ensaios foi mensurada no início e ao final da reação durante quatro minutos em leitora de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), a 420 nm. Um controle foi realizado, utilizando tampão no lugar das amostras. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de sequestro do radical  $\text{O}_2^-$  (%), de acordo com a Equação 5:

$$Atividade\ antioxidante\ (\%) = \left( \frac{(\Delta A_{controle}/min) - \Delta A_{amostra}/min}{\Delta A_{controle}/min} \right) \times 100$$

(Equação 5)

Onde,  $A_{amostra}$  representou a absorbância do ensaio completo com os peptídeos e  $A_{controle}$  representou a absorbância do ensaio contendo tampão no lugar das amostras.

### 2.6.5 Atividade quelante de cobre ( $Cu^{2+}$ )

A atividade quelante de cobre foi realizada de acordo com metodologia de Sánchez-Vioque et al. (2012), com poucas modificações. A mistura reacional de 500  $\mu$ L de tampão acetato (50 mM a pH 6,0) e 12,5  $\mu$ L de  $CuSO_4$  a 5mM foram adicionados a 125  $\mu$ L dos peptídeos. Transcorridos 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, 12,5  $\mu$ L de violeta de pirocatecol (VP) a 4mM foram adicionados aos ensaios. Após mais 30 minutos, a absorbância dos ensaios foi mensurada a 632 nm, em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6<sup>®</sup>, Cambridge, Reino Unido). Como controle, água destilada foi usada no lugar das amostras. A porcentagem de inibição (%) da formação do complexo VP- $Cu^{2+}$  foi calculada seguindo a Equação 6:

$$Atividade\ quelante\ (\%) = \left( \frac{A_{Controle} - A_{Amostra}}{A_{Controle}} \right) \times 100$$

(Equação 6)

Onde,  $A_{controle}$  foi a absorbância do controle, com água destilada; e  $A_{amostra}$  foi a absorbância das amostras contendo os peptídeos.

### 2.6.6 Atividade quelante de ferro (Fe<sup>2+</sup>)

A habilidade dos peptídeos em quelar o Fe<sup>2+</sup> foi avaliada de acordo com metodologia de Sánchez-Vioque et al. (2012), com poucas modificações. Quantidade de 125 µL dos peptídeos foram adicionados a 500 µL de tampão de acetato de sódio (0,1 M a pH 4,9) e a 12,5 µL de cloreto de ferro 2. Após incubação da mistura reacional por 30 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 50 µL de ferrozina (5 mM) aos ensaios. Após mais 30 minutos, a absorbância foi mensurada a 562 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido). A atividade quelante de ferro foi expressa em porcentagem de inibição da formação do complexo ferrozina-Fe<sup>2+</sup> (%) e calculada segundo a Equação 7:

$$\textit{Atividade quelante} (\%) = \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100$$

(Equação 7)

Onde, A<sub>controle</sub> representa a absorbância do controle negativo, com substituição dos peptídeos por água destilada; e A<sub>amostra</sub> representa a absorbância do ensaio com os peptídeos.

### 2.6.7 Atividade anti-hipertensiva

A habilidade dos peptídeos dos queijos em inibir a ECA foi realizada seguindo ensaio proposto por Cushman & Cheung (1971), com adaptações realizadas por Zhang et al. (2009), onde 25 µL dos peptídeos e 25 µL de ECA a 5 mU (solubilizado em tampão fosfato de sódio pH 8,3 a 50 mM) foram incubados a 25 µL de N-Hippuril-L-histidil-L-leucina (HHL) a 5 mM (solubilizado em tampão fosfato de sódio pH 8,3 a 1 M) por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, 75 µL de HCl (1 M) e 500 µL de acetato de etila foram adicionados ao ensaio. Após 15 segundos, foi realizada a centrifugação a 3000 RPM por 10 minutos e 250 µL da fase orgânica (acetato de etila) foram transferidos para um tubo de ensaio limpo, que levado a banho fervente

por 15 minutos. O resíduo resultante da evaporação foi ressuspendido em 1,5 mL de água deionizada. A absorvância dos ensaios foi mensurada a 228 nm em espectrofotômetro Libra S22 (Biochrom®, Áustria) a atividade anti-hipertensiva foi expressa em porcentagem (%), de acordo com a Equação 8:

$$\textit{Atividade anti - hipertensiva (\%)} = \left( \frac{A - B}{A - C} \right) \times 100$$

(Equação 8)

Onde, *A* representa a atividade da ECA sem nenhuma inibição, *B* representa a atividade da ECA sob a influência dos peptídeos e *C*, a absorvância referente ao HHL submetido a todo ensaio experimental.

#### 2.6.8 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos dos queijos foi realizada seguindo ensaio proposto por Wu et al. (2013) com poucas modificações. Neste estudo, concentrações de 0,39 a 50 mg.mL<sup>-1</sup> dos peptídeos foram analisados frente à quatro bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Primeiramente, as bactérias em estoque foram cultivadas em caldo triptona de soja por 12 horas a 37 °C, em estufa bacteriológica. Os ensaios consistiram de 100 µL da amostra ultrafiltrada, 90 µL de caldo Mueller Hinton e 10 µL de suspensão bacteriana, previamente padronizada a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em espectrofotômetro, correspondente ao valor 0,5 da escala de McFarland. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis (Corning®). Para efeito de cálculo, um controle negativo foi realizado com água destilada estéril no lugar da amostra ultrafiltrada, seguindo as mesmas condições dos demais testes. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e incubados durante 24

horas a 37 °C. Transcorrido o tempo, as absorbâncias das amostras foram mensuradas a 600 nm em leitora de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A atividade antimicrobiana foi expressa em porcentagem de inibição de crescimento (%) e calculada através da Equação 9:

$$Atividade\ antimicrobiana\ (\%) = \left( \frac{A_{Controle} - A_{Amostra}}{A_{Controle}} \right) \times 100$$

(Equação 9)

Onde,  $A_{Controle}$  foi a absorbância do controle negativo, com água estéril no lugar dos peptídeos e  $A_{Amostra}$  foi a absorbância dos peptídeos, nas variadas concentrações.

## 2.7 Análises estatísticas

Os experimentos envolvendo as atividades biológicas dos peptídeos foram conduzidos em triplicata, utilizando delineamento inteiramente casualizado. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio de um esquema fatorial 2 x 2 x 8, para investigar os efeitos dos diferentes coagulantes, tamanhos e concentrações dos peptídeos nas atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas, respectivamente. As comparações de médias foram realizadas usando teste Tukey ( $p < 0,05$ ), usando o software SISVAR (Ferreira, 2011) e os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Rendimento bruto dos queijos

O queijo obtido pela ação do coagulante comercial apresentou maior rendimento (18,63%), em comparação ao obtido pela ação do coalho produzido por *A. tamaritii* URM6599 (16,14%). Na análise do rendimento econômico foi observado que o coalho de fonte comercial

produziu um quilo de queijo Minas Frescal com 5,37 litros de leite e o coagulante microbiano produziu um quilo com 6,20 litros de leite caprino.

Apesar do coagulante microbiano produzido por *A. tamaritii* ter apresentado menor rendimento econômico quando comparado ao coalho de fonte comercial, a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Governo do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) considera a utilização de 6 a 6,5 L/kg de queijo Minas Frescal produzido como um bom rendimento (Bragança, 2001).

O rendimento do queijo é influenciado por muitos fatores, alguns dos mais importantes incluem a composição, a qualidade das práticas de armazenamento e os pré-tratamentos do leite, e o tipo de coagulante utilizado, que idealmente deve hidrolisar a ligação Fenilalanina<sub>105</sub>-Metionina<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína durante a coagulação do leite. Vários coagulantes utilizados na fabricação de queijos diferem em sua atuação e alguns coagulantes de origem microbiana apresentam diferentes padrões de clivagem com resultados satisfatórios na utilização (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2017).

O coagulante microbiano do *A. tamaritii* em estudos anteriores (dados não apresentados) demonstrou possuir, em sua composição, a existência de pelo menos duas enzimas coagulantes do leite; além disso, o padrão de clivagem dessas enzimas pode ser diferente da quimosina presente no coalho comercial, o que propicia a perda de proteínas para o soro, comportamento observado pelo menor rendimento encontrado neste coagulante.

### 3.2 Atividade antioxidante dos peptídeos dos queijos

De forma geral, ambos os queijos apresentaram atividade antioxidante, bem como os peptídeos de diferentes tamanhos; em relação às concentrações, apenas no ensaio de captura do radical OH<sup>•</sup> algumas concentrações menores não apresentaram atividade (Tabelas 1 a 6). Este comportamento é interessante e reforça os achados na literatura, que cita componentes

biologicamente ativos em alimentos, em especial àqueles derivados do leite, como detentores de papel crucial na redução do impacto das espécies reativas ao oxigênio, tais como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e peroxil, ( $ROO^\bullet$ ) formados por células sob estresse oxidativo (Benbrook, 2005).

Estes compostos, especialmente os peptídeos derivados de proteína, possuem capacidade de doar elétrons para neutralizar os radicais livres (Aluko, 2012). Entretanto, o mecanismo antioxidante pode envolver uma série de ações complexas, como a eliminação de radicais, a quelação de íons metálicos pró-oxidativos, redução de peróxidos, dentre outros. Neste sentido, os peptídeos bioativos derivados do leite são únicos quando comparados com outros compostos antioxidantes alimentares, pois podem potencialmente atuar como antioxidantes multifuncionais, inibindo vários compostos por diferentes caminhos (Elias et al., 2008).

### 3.2.1 Captura do radical $ABTS^{+\bullet}$

Os peptídeos do queijo obtido com as enzimas coagulantes microbianas do *A. tamarii* URM6599 apresentaram maiores atividades antioxidantes quando comparados àqueles do queijo comercial. As atividades no queijo *A. tamarii* variaram de  $91,86 \pm 0,08$  a  $1,73 \pm 0,52\%$  e no queijo comercial, estas foram de  $86,56 \pm 0,76$  a  $0,77 \pm 0,22\%$  (Tabela 1).

Em relação aos peptídeos de tamanhos moleculares diferentes, os peptídeos  $<10$  kDa apresentaram maior atividade de captura do radical  $ABTS^{+\bullet}$ , em ambos os queijos ( $p < 0,05$ ). As atividades antioxidantes dos peptídeos  $<10$  kDa do queijo *A. tamarii* variaram de  $2,94 \pm 0,08$  a  $91,86 \pm 0,08\%$ ; os peptídeos com  $<3$  kDa apresentaram atividades antioxidantes de  $1,73 \pm 0,52$  a  $86,66 \pm 0,87\%$ . No queijo comercial, os peptídeos com tamanho molecular  $<10$  kDa apresentaram atividades de  $1,06 \pm 0,22$  a  $86,56 \pm 0,76\%$ , enquanto os de tamanho molecular  $<3$  kDa apresentaram  $0,77 \pm 0,22$  a  $60,98 \pm 0,72\%$

A maior atividade de sequestro deste radical por peptídeos do queijo *A. tamaritii* pode ser atribuída principalmente pelo fato da utilização do extrato enzimático bruto para a produção do queijo, reconhecidamente um extrato complexo que apresentou em estudos anteriores a possibilidade de existência de mais de uma protease coagulante (dados não apresentados). Dessa forma, a hipótese é que essas proteases agiram de forma simultânea na catálise de outras ligações proteicas das frações de caseína e liberaram diferentes peptídeos antioxidantes, diferente da enzima comercial utilizada que possui especificidade na ligação Fenilalanina<sub>105</sub>-Metionina<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína.

Ayyash, Al-Nuaimi, Al-Mahadin, & Liu (2018) trabalharam com a atividade antioxidante de leites fermentados de origem bovina e de camelo, sendo o último a apresentar maior atividade de captura do radical ABTS<sup>+</sup>. Os autores, além de atribuírem este achado à natureza diferente dos peptídeos bioativos, também relataram que há a possibilidade do leite fermentado de camelo ter apresentado esta característica devido a uma maior taxa de hidrólise do leite pelas cepas probióticas, que corrobora que uma maior hidrólise das proteínas do leite tendem a aumentar a atividade antioxidante.

Sabe-se que as atividades antioxidantes apresentadas por peptídeos são influenciadas por vários fatores, dentre eles a massa molecular. A literatura reporta que é mais comum os peptídeos de baixa massa molecular apresentarem atividades antioxidantes (Sheih et al., 2009), todavia em nosso estudo quanto à captura do radical ABTS<sup>+</sup>, os peptídeos de massas moleculares maiores apresentaram melhor atividade. Sabe-se que o radical ABTS<sup>+</sup> é reduzido na presença de compostos antioxidantes doadores de hidrogênio (Corrêa et al., 2011). Nesta perspectiva, há possibilidade de peptídeos de massas moleculares maiores apresentarem maior capacidade de doação de hidrogênios, por apresentarem cadeias mais longas.

Em relação às concentrações, ambos os queijos apresentaram melhores atividades nas maiores concentrações (Tabela 1). No queijo *A. tamaritii* as concentrações de 50 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>

não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em ambos peptídeos. Considerado um resultado interessante, já que na concentração de  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$  pode-se obter a mesma atividade que a encontrada a  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; dessa forma, a menor concentração pode ser utilizada sem prejuízos à atividade antioxidante.

No queijo comercial, apenas os peptídeos  $<3 \text{ kDa}$  apresentaram diferença significativa entre as maiores concentrações. De forma geral, como dito anteriormente, a tendência observada foi de incremento na atividade antioxidante nas maiores concentrações, atingindo atividades antioxidantes que variaram de  $60,98 \pm 0,72\%$  (menor atividade detectada dentre as concentrações de  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) a  $91,86 \pm 0,08$  (maior atividade detectada a  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$  no queijo *A. tamaritii* nos peptídeos de  $<10 \text{ kDa}$ ).

Resultados semelhantes foram encontrados por Timón et al. (2014) em peptídeos de baixa massa molecular ( $<3 \text{ kDa}$ ) de queijo tipo Burgo. Os autores também observaram que as maiorias atividades eram encontradas nas maiores concentrações.

### 3.2.2 Captura do radical DPPH<sup>•</sup>

As enzimas coagulantes utilizadas e os peptídeos de massas moleculares diferentes não apresentaram diferenças estatísticas. Somente a concentração influenciou na atividade. De forma similar ao comportamento dos peptídeos na captura do radical ABTS<sup>+</sup>, as concentrações de  $50$  e  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$  não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

As atividades dos peptídeos de ambos os queijos, massas moleculares e concentrações variaram de  $82,85 \pm 0,11$  (no queijo *A. tamaritii*, nos peptídeos  $<3 \text{ kDa}$ ) a  $17,83 \pm 1,23\%$  (no queijo comercial, nos peptídeos  $<3 \text{ kDa}$ ). São resultados promissores, principalmente quando comparados aos achados de Timón et al. (2014). Esses autores avaliaram atividades antioxidantes de peptídeos de baixa massa molecular ( $<3 \text{ kDa}$ ) de queijo tipo Burgo utilizando

o radical DPPH<sup>•</sup> e verificaram uma redução do radical de  $8,99 \pm 2,18\%$ , a uma concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , quando do uso de enzima coagulante microbiana.

O presente estudo apresentou resultados superiores, quando comparados ao trabalho de Timón et al. (2014). Nas concentrações de  $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ , as atividades encontradas para os queijos *A. tamarii* e comercial nos peptídeos de  $<3 \text{ kDa}$  foram de  $19,51 \pm 1,79$  e  $17,94 \pm 2,16\%$ , respectivamente. Isso demonstra que, além do tipo de enzima utilizada, os tipos de processamento do queijo, bem como a origem do leite utilizado para a produção, também contribuem para as diferenças de ação nas atividades.

Meira et al. (2012) também avaliaram a atividade antioxidante de seis tipos de queijos, os Cerrillano, Feta, Pecorino, Pecorino Sardo, Pecorino Toscano e Roquefort, produzidos com leite ovino. Os seis tipos apresentaram atividade frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> e somente o Roquefort apresentou atividade de captura do radical DPPH<sup>•</sup>, com atividade antioxidante de  $22,81\% \pm 0,09$ . Diferente do resultado de Meira et al. (2012), queijos produzidos com coagulante de *A. tamarii* e de fonte comercial, no presente estudo, apresentaram maiores atividades frente a este radical.

Sarmadi & Ismail (2010) relatam que a atividade antioxidante de peptídeos pode ser relacionada também a um maior número de grupos ionizáveis e por um maior conteúdo de grupos hidrofóbicos. Neste último caso, em contato com uma amostra rica em peptídeos hidrofóbicos, o radical DPPH<sup>•</sup> apresentaria mais facilidade em ser reduzido, pois o radical é dissolvido em metanol, solvente orgânico em que os peptídeos hidrofóbicos apresentariam melhor difusão.

### 3.2.3 Inibição da formação dos radicais OH<sup>•</sup> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>

O queijo comercial apresentou melhores resultados de inibição do radical e foi significativamente maior que o queijo *A. tamarii*. De uma forma geral, o queijo *A. tamarii*

apresentou peptídeos com massas moleculares <10 kDa com maior atividade antioxidante, em relação aos <3 kDa. Os peptídeos com massas <10 kDa e <3kDa obtidos do queijo comercial não apresentaram diferenças, excetuando-se pelos resultados encontrados nas concentrações de 12,5 e 0,39 mg.mL<sup>-1</sup>, em que os peptídeos <3kDa e <10 kDa apresentaram maior poder de captura do radical, respectivamente (Tabela 3).

As atividades antioxidantes em relação às concentrações apresentaram diferenças significativas. Entretanto, nas maiores concentrações (50 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>) as atividades de inibição de formação do radical OH<sup>\*</sup> para todos os tratamentos não diferiram (Tabela 3). Essas concentrações foram capazes de capturar por completo o radical, com 100% de atividade.

No ensaio de inibição de formação do radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>, foi observado que os queijos não diferiram entre si, exceto nas concentrações de 6,25; 3,12 e 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>, nos peptídeos <10 kDa, em que a atividade dos peptídeos do queijo *A. tamarii* foi sobretudo maior e diferiram ( $p < 0,05$ ). As diferenças entre as massas moleculares dos peptídeos também não foram significativas e somente a variável concentração influenciou a atividade nesta metodologia. As atividades antioxidantes no queijo *A. tamarii* variaram de  $59,46 \pm 0$  a  $100 \pm 0\%$  e no queijo comercial de  $43,24 \pm 8,11$  a  $100 \pm 0\%$  (Tabela 4).

Radicais de oxigênio constituem uma variedade de moléculas reativas que causam estresse oxidativo nas células. Cerca de 5% do total do metabolismo do oxigênio das células do fígado resulta na produção de espécies de oxigênio parcialmente reduzidas (Singh e Singh, 2008). O radical hidroxila (OH<sup>\*</sup>) é o radical livre mais reativo e pode ser formado a partir de outras espécies reativas, como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ou peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na presença de íons metálicos. É um radical que pode facilmente reagir com biomoléculas, tais como aminoácidos, lipídios, DNA e proteínas (You et al., 2010). Portanto, a remoção do radical OH<sup>\*</sup> é provavelmente uma das defesas mais eficazes contra várias doenças (Zhuang et al., 2013).

Inúmeras reações biológicas geram radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ). É considerada uma espécie reativa tóxica e atua potencialmente como precursora de outras espécies, como o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ). Dessa forma, estudar a eliminação deste radical é importante (Zhuang et al., 2013).

Apesar da importância no controle dessas espécies reativas de oxigênio (EROS), até agora não há relatos da utilização destas metodologias para avaliação da capacidade antioxidativa de queijos. Em um dos poucos trabalhos que relatam a atividade de inibição de formação do radical  $O_2^-$  em outros produtos advindos do leite caprino, Ahmed, El-Bassiony, Elmalt, & Ibrahim (2015) trabalharam com peptídeos derivados de caseína caprina que apresentaram forte atividade de sequestro do radical  $O_2^-$ . Assim, a escolha pela utilização de leite caprino na produção dos queijos avaliados neste estudo também deve ser considerada importante. O interesse por queijos e peptídeos derivados do leite caprino vem intensificando, de forma especial por causa de sua baixa alergenicidade e por apresentar-se uma potencial fonte de novos peptídeos biológicos.

Outros estudos foram realizados com caseínas de outras espécies animais em relação à captura e inibição dos radicais  $OH^\bullet$  e  $O_2^-$ . Hodayouni-Tabrizi, Asoodeh, & Soltani (2017) trabalharam com peptídeos derivados da caseína de leite de camelo e encontraram atividades de captura destes radicais. Neste estudo, de forma similar com os nossos achados, a atividade de inibição foi maior em concentrações maiores para ambas metodologias de captura das EROS.

#### 3.2.4 Atividades quelantes de cobre e ferro

A concentração dos peptídeos foi a que mais diferiu na atividade quelante de ferro e os outros fatores avaliados, queijos e os peptídeos com diferentes massas moleculares, apresentaram as mesmas atividades quelantes de ferro. As atividades variaram de  $6,95 \pm 2,71$  a

74,98 ± 2,25% no queijo *A. tamaritii* e 7,70 ± 1,26 a 73,66 ± 5,49% no queijo comercial (Tabela 5).

Em relação a concentração, a atividade quelante foi maior em concentrações maiores, em todos os tratamentos (Tabela 5). Também foi significativamente diferente das demais na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Meira et al. (2012) relataram que, a 50 mg.mL<sup>-1</sup>, os queijos Pecorino Toscano e Pecorino Sardo apresentaram capacidade de quelação de ferro de 55,14 e 50,73%, respectivamente. Sendo estes resultados foram considerados os melhores de todo o estudo. Os queijos Minas Frescal produzidos no presente estudo apresentaram, na mesma concentração, valores superiores de quelação de 74,98 ± 2,25 e 73,38 ± 1,13% para o queijo *A. tamaritii* para os peptídeos de massas moleculares <10 kDa e <3 kDa, respectivamente; e apresentou 73,66 ± 5,49 e 66,90 ± 0,42% para o queijo comercial, nos peptídeos < 10 kDa e < 3 kDa, respectivamente.

Quanto às atividades quelantes de cobre (Tabela 6), todas as variáveis analisadas foram estatisticamente diferentes. O queijo produzido pelas proteases coagulantes do *A. tamaritii*, os peptídeos <10 kDa e as maiores concentrações apresentaram maior atividade quelante de cobre.

A atividade quelante nas maiores concentrações ficou acima dos 80%, entretanto no queijo *A. tamaritii* as concentrações de 50 a 3,12 mg.mL<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente em ambos peptídeos; com isso, uma menor concentração de peptídeos pode ser suficiente para um excelente efeito quelante. No queijo comercial também foi possível detectar a mesma tendência.

A quelação de metais, como a complexação de íons de ferro ou cobre é frequentemente estudada como um mecanismo antioxidante indireto, uma vez que após a complexação do metal as reações em cadeia são inibidas e os fenômenos de oxidação são atrasados. Na verdade, em sistemas vivos, a presença de metais transitórios como o Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> envolvem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como os radicais hidroxila, formados através da reação de Fenton. Além disso, íons ferrosos podem catalisar a formação de radicais hidroxílicos através

da reação de Harber-Weiss, que ocorre na presença do radical ânion (Canabady-Rochelle et al., 2018).

O uso de compostos capazes de quelar metais é bastante diverso. Em alimentos, este tipo de atividade é importante na prevenção de rancificação, que altera o sabor dos mesmos (Hidalgo et al., 2015). Outro viés importante a ser tratado é a importância desses compostos na prevenção e tratamento de algumas patologias. Em muitas doenças neurodegenerativas, o cobre foi identificado como componente importante na desregulamentação do controle homeostático do cérebro. A presença deste íon pode causar efeitos tóxicos, principalmente através do estresse oxidativo induzido pelo aumento de espécies reativas de oxigênio. Além disso, pode ser responsável pela manifestação de distúrbios hereditários, como as doenças de Wilson e Menkes (Melo et al., 2017).

### 3.3 Atividade anti-hipertensiva dos peptídeos dos queijos

Todos os peptídeos estudados (<3 kDa e <10 kDa), dos queijos (comercial e *A. tamaritii*) e em todas as concentrações (50 a 0,39 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentaram habilidade em inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Tabela 7). Aqueles provenientes do queijo *A. tamaritii* foram mais eficientes em inibir a ECA, quando comparado aos peptídeos do queijo comercial, sobretudo os peptídeos de massa molecular <3 kDa, que apresentaram atividade anti-hipertensiva expressiva, variando de 21,55 ± 0,72 a 72,33 ± 0,54%, enquanto que o queijo comercial apresentou atividades de 15,64 ± 0,27 a 60,51 ± 1,61%.

No queijo comercial a tendência também foi observada, principalmente nas concentrações de 50, 3,12 e 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>, que diferiram estatisticamente dos peptídeos de massa molecular de <10 kDa, com maiores percentuais de inibição da ECA (p < 0,05).

Similar aos achados deste estudo, Gómez-Ruiz, Ramos, & Recio (2002) trabalharam com queijo tipo Manchego, um dos queijos mais populares na Espanha, produzido com leite de

ovelha e coagulante de origem animal, e verificaram que os peptídeos <3 kDa presentes no extrato aquoso do queijo demonstraram considerável contribuição na inibição da ECA. Da mesma forma, Lignitto et al. (2010) avaliaram os peptídeos de massas moleculares <3 kDa e < 10 kDa do queijo Asiago d'Alleva quanto a atividade de inibição da ECA e encontraram nos peptídeos <3 kDa maior atividade anti-hipertensiva, e concluíram que os peptídeos mais curtos foram os responsáveis pelo efeito inibitório da ECA do que os mais longos, presentes na fração <10 kDa.

Outro fato interessante é que peptídeos com massa molecular menor são também reconhecidos pela probabilidade de resistência à proteólise *in vivo*, assim, esses compostos podem apresentar longa e efetiva ação dentro do corpo, não sendo degradados ou inativados; é o caso dos conhecidos tripeptídeos Valina-Prolina-Prolina e Isoleucina-Prolina-Prolina, detectados em leite fermentado bovino, que possuem expressiva atividade anti-hipertensiva (Mizuno et al., 2004; Nakamura et al., 1995).

Vários métodos foram concebidos para estimar potenciais propriedades anti-hipertensiva de peptídeos. Sobre a inibição da ECA, Aluko (2015) explica que a ação inibitória dos peptídeos e hidrolisados pode ser por meio de interações peptídicas competitivas, não competitivas ou mesmo pelas duas. Em uma interação competitiva, por exemplo, os peptídeos concorrem diretamente com o substrato específico da enzima. No caso deste estudo, o HHL utilizado na metodologia como substrato da ECA, é composto por um tripeptídeo (Glicina-Histidina-Leucina), que apresenta baixa massa molecular; assim, os peptídeos originários dos queijos deste estudo, especialmente os <3 kDa, podem competir com o HHL, inibindo desta forma a ação da ECA.

Estudos já demonstraram que os peptídeos derivados de variados tipos de queijo possuem ação anti-hipertensiva *in vivo*. Peptídeos originários de queijo Gouda, por exemplo, apresentaram efeito depressivo sobre a pressão arterial sistólica em ratos espontaneamente

hipertensos (REH) (Saito et al., 2000). No estudo de Lollo et al. (2015), um queijo Minas Frescal probiótico foi elaborado e avaliado o efeito do consumo do queijo por REH durante 15 dias sobre os parâmetros de hipertensão arterial; como resultado, os animais alimentados com o queijo Minas Frescal probiótico apresentaram pressão sanguínea significativamente mais baixa. Os autores sugeriram que peptídeos com propriedades anti-hipertensivas foram responsáveis pelo excelente resultado do estudo.

O consumo do queijo Minas Frescal pode apresentar-se como uma alternativa alimentar saudável para indivíduos hipertensos, entretanto, ensaios clínicos devem ser realizados a fim de investigar a ação dos peptídeos originários em humanos.

#### 3.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos dos queijos

De maneira geral, todos os tratamentos apresentaram alguma atividade antimicrobiana, com exceção do ensaio que envolveu o queijo comercial contra *L. monocytogenes* ATCC 19114, que não inibiu o crescimento do micro-organismo (Tabela 8).

O queijo *A. tamaritii* inibiu em maior proporção *E. coli* ATCC 25922, quando comparado ao queijo comercial ( $p < 0,05$ ). Além disso, os peptídeos  $<3$  kDa apresentaram maior atividade microbicida do que os  $<10$  kDa, com atividade até a concentração de  $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; os peptídeos  $<10$  kDa apresentaram atividade até a concentração de  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . O queijo comercial por sua vez inibiu o micro-organismo até as concentrações de 25 e  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ , para os peptídeos  $<3$  kDa e  $<10$  kDa, respectivamente.

Na atividade antimicrobiana frente *L. monocytogenes* ATCC 19114, o queijo *A. tamaritii* também apresentou melhor atividade ( $p < 0,05$ ). Como citado anteriormente, os peptídeos estudados no queijo comercial não foram capazes de impedir o crescimento microbiano. Neste ensaio, as menores concentrações dos peptídeos do queijo *A. tamaritii* foram capazes de inibir o crescimento microbiano, enquanto as maiores não. A atividade foi elevada a partir da

concentração de  $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ , para ambos peptídeos de massas moleculares diferentes ( $<3 \text{ kDa}$  e  $<10 \text{ kDa}$ ).

No ensaio que envolveu *S. typhimurium* ATCC 14028, o queijo comercial apresentou maior atividade microbicida nas concentrações mais baixas, a partir de  $3,12$  e  $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$  para os peptídeos  $<3 \text{ kDa}$  e  $<10 \text{ kDa}$ , respectivamente. Entretanto essas atividades foram baixas, com  $2,88 \pm 1,46$  a  $9,01 \pm 1,46\%$  de inibição. Por outro lado, o queijo *A. tamaritii* apresentou maiores atividades na menor concentração do estudo ( $0,39 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), com percentuais de inibição de  $21,80 \pm 4,79$  e  $23,00 \pm 3,35\%$  para os peptídeos  $<3 \text{ kDa}$  e  $<10 \text{ kDa}$ , respectivamente, o que demonstra que os peptídeos provenientes deste queijo foram mais efetivos no controle microbiano de *S. typhimurium* ATCC 14028.

De todos os ensaios antimicrobianos, a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 foi o micro-organismo que sofreu maior inibição de crescimento quando em contato com os peptídeos analisados neste estudo. As atividades variaram de  $1,30 \pm 1,47$  a  $60,10 \pm 8,01\%$ , no teste que envolveu o queijo comercial e peptídeos  $<10 \text{ kDa}$  e nos peptídeos  $<3 \text{ kDa}$ , respectivamente. A atividade inibitória foi maior nas maiores concentrações, em todos os tratamentos testados.

O queijo *A. tamaritii* apresentou atividade até a concentração de  $3,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ , enquanto o queijo comercial apresentou atividade até  $6,25$  e  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  para os peptídeos  $<3 \text{ kDa}$  e  $<10 \text{ kDa}$ , respectivamente.

O fato dos peptídeos de ambos os queijos apresentarem inibição frente *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 nas maiores concentrações pode ser explicada pelo mecanismo antimicrobiano conhecido como *carpet*. Neste modelo, os peptídeos em altas concentrações orientam-se de forma paralela à membrana microbiana, de modo que a porção hidrofílica se direcione ao centro hidrofóbico da membrana, com manutenção do contato com as cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos, o que causa a ruptura da membrana (Brogden, 2005).

Apesar do conhecimento sobre as atividades antimicrobianas que peptídeos obtidos de queijos podem apresentar, estudos acerca dessa temática ainda são escassos. Entretanto, alguns trabalhos foram realizados e demonstraram a potencialidade destes quando encontrados. Pritchard, Phillips, & Kailasapathy (2010) mostraram que três peptídeos presentes no queijo comercial Cheddar australiano exibiu atividades antimicrobianas contra *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538 e *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Rizzello et al. (2005) informaram que os queijos Pecorino Romano, Canestrato Pugliese, Crescenza e Caprino del Piemonte continham vários peptídeos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *L. innocua* DSM 20649. Lignitto et al. (2012) também encontraram peptídeos, do queijo italiano Asiago d'Alleva, capazes de inibir o crescimento de *L. innocua* LRGIA 01.

Neste estudo, a maioria dos micro-organismos foram inibidos pelos dois tipos de queijo, excetuando-se *L. monocytogenes* ATCC 19114, no queijo comercial. Também foi possível observar que os dois micro-organismos Gram positivos (*L. monocytogenes* ATCC 19114 e *S. aureus* ATCC 25923) e os Gram negativos (*E. coli* ATCC 25922 e *S. typhimurium* ATCC 14028) apresentaram comportamentos diferentes entre si, em relação à concentração dos peptídeos.

A atividade biológica desses peptídeos antimicrobianos é também largamente afetada por sua composição de aminoácidos, sequência e tamanho dos peptídeos (Wald et al., 2016). No caso dos queijos produzidos nesta pesquisa, além da concentração e tamanho dos peptídeos, é possível notar que outros fatores também interferiram em sua atuação; é possível que a composição de aminoácidos e o modo de atuação dos peptídeos, para além dos modelos de interação com a membrana plasmática previamente observados em algumas espécies estudadas, foram fatores também determinantes neste quesito. Isso explicaria o fato dos peptídeos

apresentarem maior atuação em concentrações mais baixas nos micro-organismos *L. monocytogenes* ATCC 19114 e *S. typhimurium* ATCC 14028.

No geral, os resultados encontrados nesta pesquisa são importantes, principalmente porque as espécies inibidas são as principais espécies encontradas em queijos e extremamente relacionadas a doenças transmitidas por alimentos (Mor-Mur e Yuste, 2010).

#### 4. CONCLUSÕES

Os peptídeos obtidos a partir do queijo elaborado com extrato enzimático de *A. tamarii* URM6599 apresentaram atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana, com resultados melhores quando comparado ao queijo produzido com coagulante microbiano comercial nos ensaios de captura do radical ABTS<sup>•+</sup>, quelação de cobre, atividade anti-hipertensiva e frente aos micro-organismos *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 19114 e *S. aureus* ATCC 25923; além disso, as concentrações de peptídeos e as diferentes massas moleculares utilizadas diferiram estatisticamente em alguns ensaios. Assim, o novo coagulante demonstra potencial de uso para elaboração de queijo Minas Frescal caprino funcional. Outros estudos são necessários, referentes à toxicidade dos peptídeos obtidos, bem como das propriedades física e químicas do queijo obtido. O estudo também demonstra que o queijo Minas Frescal caprino, produto tipicamente brasileiro, é um produto que apresenta peptídeos biologicamente ativos com capacidade antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana em sua composição. Ademais, os peptídeos de ambos os queijos podem ainda serem utilizados como ingredientes nutracêuticos em alimentos funcionais.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), por meio do processo IBPG-1413-5.07/13, e estrutural da

UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco), do CENLAG (Centro Laboratorial Multiusuário de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns) e do CT LATÍCIÑIOS (Centro Tecnológico Instituto de Laticínios do Agreste).

## 6. REFERÊNCIAS

Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80–88.

Aluko, R. E. (2012). *Functional Foods and Nutraceuticals*. New York: Springer.

Ayyash, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S., & Liu, S. Q. (2018). In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 239, 588–597.

Bragança, M. G. L. (2001). Processamento do Leite: Queijo Minas Frescal, Meia-Cura, Mussarela.

<http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/LivrariaVirtual/processamento%20do%20leite.pdf> Acessado em 01 de fevereiro de 2017

Benbrook, C. (2005). Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing. *The Organic Center*, 81.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250.

Canabady-Rochelle, L. L. S., Selmeczi, K., Collin, S., Pasc, A., Muhr, L., & Boschi-Muller, S. (2018). SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 239, 478–485.

Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., ... Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2247–2254.

Cushman, D. W., & Cheung, H. . S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the

- angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637–1648.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039–1042.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science* (2 Ed.). Nova York: Springer, (Cap. 7 e 10)
- Furtado, M. M. (2017). Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. (3ª Ed.) São Paulo: Fonte Comunicações e Editora.
- Frau, F., Font de Valdez, G., & Pece, N. (2014). Effect of pasteurization temperature, Starter Culture, and incubation temperature on the physicochemical properties, yield, rheology, and sensory characteristics of ppreadable goat cheese. *Journal of Food Processing*, 2014, 1–8.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12(8), 697–706.
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 13–22.
- Hidalgo, M. E., Côrrea, A. P. F., Mancilla Canales, M., Daroit, D. J., Brandelli, A., & Risso, P. (2015). Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocolloids*, 43, 510–520.
- Homayouni-Tabrizi, M., Asoodeh, A., & Soltani, M. (2017). Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 567–575.
- Lamichhane, P., Kelly, A. L., & Sheehan, J. J. (2017). Invited review: Structure-function relationships in cheese. *Journal of Dairy Science*, 101, 1–18.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444–450.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., ... Segato, S. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago

d'allevo cheese. *International Dairy Journal*, 20(1), 11–17.

Lignitto, L., Segato, S., Balzan, S., Cavatorta, V., Oulahal, N., Sforza, S., ... Novelli, E. (2012). Preliminary investigation on the presence of peptides inhibiting the growth of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in Asiago d'Allevo cheese. *Dairy Science and Technology*, 92(3), 297–308.

Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Moura, C. S., Almada, C. N., Felicio, T. L., Esmerino, E. A., ... Cruz, A. G. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Research International*, 76, 611–617.

Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329.

Melo, M. M. A., Daniele-Silva, A., Teixeira, D. G., Estrela, A. B., Melo, K. R. T., Oliveira, V. S., ... Fernandes-Pedrosa, M. F. (2017). Structure and in vitro activities of a Copper II-chelating anionic peptide from the venom of the scorpion *Tityus stigmurus*. *Peptides*, 94, 91–98.

Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T., & Yamamoto, N. (2004). Release of short and Proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3183–3188.

Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2010). Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 24–35.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification and characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 777–783.

OECD/FAO. (2016). OECD-FAO Agricultural Outlook 2016–2025. OECD Publishing, Paris, France. [https://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2016-en](https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en). Acessado em 11 novembro 2017

Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M. C., Adesso, S., Ostacolo, C., ... Campiglia, P. (2016). Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 26, 494–505.

- Porto, A. L. F., Campos-Takaki, G. M., & Lima Filho, J. L. (1996). Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *60*, 115–122.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(8), 4712–4718.
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, *43*(5), 1545–1548.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(98), 1231–1237.
- Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science and Technology*, *66*, 48–62.
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian Cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, *88*(7), 2348–2360.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, *83*(7), 1434–1440.
- Sánchez-Vioque, R., Rodríguez-Conde, M. F., Reina-Ureña, J. V., Escolano-Tercero, M. A., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. (2012). In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products*, *39*(1), 149–153.
- Santos, W. L., Nascimento, T. C. E. S., Queiroz, A. E. S. F., Medeiros, M. B. C. L. & Moreira, K. A. (2017). Potencial antioxidante e antimicrobiano de proteínas e peptídeos bioativos solúveis em água obtidos a partir do queijo Minas Frescal. *Higiene Alimentar*, *31*, 266–267.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, *31*(10), 1949–1956.

- Sheih, I. C., Fang, T. J., & Wu, T. K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, *115*(1), 279–284.
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., ... Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal “coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, *135*(3), 1533–1538.
- Singh, S., & Singh, R. P. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, *24*(4), 392–415.
- Stuknyte, M., Cattaneo, S., Masotti, F., & De Noni, I. (2015). Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *168*, 27–33.
- Tenore, G. C., Ritieni, A., Campiglia, P., Stiuso, P., Di Maro, S., Sommella, E., ... Novellino, E. (2015). Antioxidant peptides from “Mozzarella di Bufala Campana DOP” after simulated gastrointestinal digestion: In vitro intestinal protection, bioavailability, and anti-haemolytic capacity. *Journal of Functional Foods*, *15*, 365–375.
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petró, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (< 3kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, *57*(1), 359–365.
- Villaño, D., Gironés-Vilapana, A., García-Viguera, C. & D.A. Moreno, D. A. (2016). Development of Functional Foods. In: Galanakis, C. M. (Ed), *Innovation Strategies in the Food Industry – Tools for Implementation* (pp. 191-210). London: Elsevier.
- Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., & Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, *205*, 221–228.
- Wu, S., Qi, W., Li, T., Lu, D., Su, R., & He, Z. (2013). Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chemistry*, *141*(3), 2944–2951.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, *43*(4), 1167–1173.

Zhang, C., Cao, W., Hong, P., Ji, H., Qin, X., & He, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Acetes chinensis* peptic hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(10), 2042–2048.

Zhuang, H., Tang, N., & Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1810–1821.

## TABELAS

**Tabela 1.** Atividade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamarii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamarit		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	86,66 ± 0,87 Aa <sup>a</sup>	91,86 ± 0,08 Aa <sup>a</sup>	60,98 ± 0,72 Ab <sup>b</sup>	86,56 ± 0,76 Aa <sup>a</sup>
<b>25</b>	72,5 ± 0,30 Aa <sup>a</sup>	80,97 ± 0,51 Aa <sup>a</sup>	43,3 ± 0,51 Bb <sup>b</sup>	72,11 ± 0,50 Aa <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	51,78 ± 1,59 Bb <sup>a</sup>	61,99 ± 0,43 Ba <sup>a</sup>	26,83 ± 0,53 Cb <sup>b</sup>	51,88 ± 0,29 Ba <sup>b</sup>
<b>6,25</b>	34,06 ± 0,22 Cb <sup>a</sup>	61,99 ± 0,43 Ba <sup>a</sup>	14,26 ± 0,83 CD <sup>b</sup>	31,21 ± 0,29 Ca <sup>b</sup>
<b>3,12</b>	17 ± 1,26 Db <sup>a</sup>	41,04 ± 1,26 Ca <sup>a</sup>	6,7 ± 0,67 Da <sup>b</sup>	16,43 ± 0,58 CD <sup>a</sup>
<b>1,56</b>	8,09 ± 0,88 Db <sup>a</sup>	23,75 ± 0,22 Da <sup>a</sup>	3,13 ± 0,22 Da <sup>a</sup>	8,43 ± 0,17 Da <sup>b</sup>
<b>0,78</b>	3,85 ± 0,22 Da <sup>a</sup>	6,02 ± 0,22 Ea <sup>a</sup>	1,64 ± 0,08 Da <sup>a</sup>	3,61 ± 0,14 Da <sup>a</sup>
<b>0,39</b>	1,73 ± 0,52 Da <sup>a</sup>	2,94 ± 0,08 Ea <sup>a</sup>	0,77 ± 0,22 Da <sup>a</sup>	1,06 ± 0,22 Da <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Atividade de captura do radical DPPH\* (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamaritii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamaritii		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	82,85 ± 0,11 Aa <sup>a</sup>	76,91 ± 5,09 Ab <sup>b</sup>	80,49 ± 3,59 Aa <sup>a</sup>	82,59 ± 0,52 Aa <sup>a</sup>
<b>25</b>	80,72 ± 1,84 Aa <sup>a</sup>	77,43 ± 0,85 Aa <sup>a</sup>	77,43 ± 0,85 Aa <sup>a</sup>	80,27 ± 1,47 Aa <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	46,71 ± 1,01 Ba <sup>a</sup>	42,23 ± 1,68 Ba <sup>a</sup>	35,35 ± 0,91 Bb <sup>b</sup>	46,08 ± 0,78 Ba <sup>a</sup>
<b>6,25</b>	34,75 ± 1,19 Ca <sup>a</sup>	32,59 ± 0,26 Ca <sup>a</sup>	30,49 ± 2,97 BCa <sup>a</sup>	34,83 ± 3,28 Ca <sup>a</sup>
<b>3,12</b>	29,90 ± 1,37 CDa <sup>a</sup>	32,44 ± 4,58 Ca <sup>a</sup>	28,7 ± 5,05 BCb <sup>a</sup>	33,78 ± 2,03 CDa <sup>a</sup>
<b>1,56</b>	26,91 ± 0,98 DEa <sup>a</sup>	24,89 ± 0,22 Da <sup>a</sup>	23,32 ± 0,90 CDa <sup>a</sup>	27,28 ± 0,56 DEa <sup>a</sup>
<b>0,78</b>	19,51 ± 1,79 EFa <sup>a</sup>	18,54 ± 2,07 Da <sup>a</sup>	17,94 ± 2,16 Da <sup>a</sup>	21 ± 2,77 Ea <sup>a</sup>
<b>0,39</b>	18,61 ± 0,78 Fa <sup>a</sup>	18,68 ± 0,93 Da <sup>a</sup>	17,83 ± 1,23 Da <sup>a</sup>	20,25 ± 0,91 Ea <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas (p < 0,05).

**Tabela 3.** Atividade de captura do radical OH• (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamaritii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamaritii		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>
<b>25</b>	95,29 ± 2,65 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	41,47 ± 5,79 Bb <sup>b</sup>	91,32 ± 4,85 Aa <sup>a</sup>	87,35 ± 2,65 Aa <sup>a</sup>	64,41 ± 4,04 Bb <sup>b</sup>
<b>6,25</b>	17,65 ± 5,29 Cb <sup>b</sup>	46,18 ± 6,74 Ba <sup>a</sup>	45,29 ± 0,51 Ba <sup>a</sup>	48,53 ± 5,79 BCa <sup>a</sup>
<b>3,12</b>	11,03 ± 0,44 Cb <sup>b</sup>	40,59 ± 3,85 Ba <sup>a</sup>	45,44 ± 0,44 Ba <sup>a</sup>	43,24 ± 1,76 BCDA <sup>a</sup>
<b>1,56</b>	0 ± 0 Cb <sup>b</sup>	26,18 ± 6,26 BCa <sup>a</sup>	42,79 ± 3,09 Ba <sup>a</sup>	32,94 ± 2,04 CDA <sup>a</sup>
<b>0,78</b>	0 ± 0 Cb <sup>b</sup>	24,26 ± 1,32 BCa <sup>a</sup>	26,18 ± 2,84 BCa <sup>a</sup>	27,79 ± 3,09 CDA <sup>a</sup>
<b>0,39</b>	0 ± 0 Ca <sup>a</sup>	12,79 ± 1,32 Ca <sup>a</sup>	3,97 ± 0,44 Cb <sup>a</sup>	22,50 ± 2,21CDA <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas (p < 0,05).

**Tabela 4.** Atividade de captura do radical  $O_2^-$  (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamaritii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamaritii		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>
<b>25</b>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	86,49 ± 4,68 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	78,38 ± 4,68 ABb <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>
<b>6,25</b>	86,49 ± 4,68 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	75,68 ± 0 ABa <sup>a</sup>	71,62 ± 12,16 ABa <sup>b</sup>
<b>3,12</b>	83,78 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	75,68 ± 8,11ABa <sup>a</sup>	67,57 ± 4,86 ABa <sup>b</sup>
<b>1,56</b>	83,78 ± 0 Aa <sup>a</sup>	100 ± 0 Aa <sup>a</sup>	75,68 ± 0 ABa <sup>a</sup>	67,57 ± 0 ABa <sup>b</sup>
<b>0,78</b>	67,57 ± 0 Aa <sup>a</sup>	64,86 ± 9,36 Aa <sup>a</sup>	72,97 ± 4,68 ABa <sup>a</sup>	63,51 ± 2,38 Ba <sup>a</sup>
<b>0,39</b>	64,86 ± 4,68 Aa <sup>a</sup>	59,46 ± 0 Aa <sup>a</sup>	43,24 ± 8,11 Ba <sup>b</sup>	43,24 ± 8,11 Ba <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Atividade quelante de ferro (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamaritii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamaritii		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	73,38 ± 1,13 Aa <sup>a</sup>	74,98 ± 2,25 Aa <sup>a</sup>	66,90 ± 0,42 Ab <sup>b</sup>	73,66 ± 5,49 Aa <sup>a</sup>
<b>25</b>	54,72 ± 0,92 Ba <sup>a</sup>	52,72 ± 4,22 Ba <sup>b</sup>	53,15 ± 4,19 Ba <sup>a</sup>	58,22 ± 1,64 Ba <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	41,55 ± 3,10 Ca <sup>a</sup>	27,98 ± 2,05 Cb <sup>b</sup>	34,93 ± 2,11 Ca <sup>b</sup>	38,08 ± 2,88 Ca <sup>a</sup>
<b>6,25</b>	27,39 ± 0,63 Da <sup>a</sup>	22,25 ± 5,03 CDa <sup>b</sup>	23,52 ± 1,71 Db <sup>a</sup>	28,69 ± 0,71 Da <sup>a</sup>
<b>3,12</b>	22,49 ± 3,03 Da <sup>a</sup>	17,89 ± 2,39 Da <sup>a</sup>	17,39 ± 0,07 DEa <sup>a</sup>	18,87 ± 0 Ea <sup>a</sup>
<b>1,56</b>	9,39 ± 1,04 Eb <sup>b</sup>	15,40 ± 0,45 DEa <sup>a</sup>	15 ± 0,07 EFa <sup>a</sup>	7,54 ± 2,46 Fb <sup>b</sup>
<b>0,78</b>	8,73 ± 2,34 Ea <sup>a</sup>	9,30 ± 2,35 Ea <sup>a</sup>	10,75 ± 4,71 EFa <sup>a</sup>	8,66 ± 0,21 Fa <sup>a</sup>
<b>0,39</b>	6,95 ± 2,71 Ea <sup>a</sup>	7,42 ± 4,59 Ea <sup>a</sup>	7,70 ± 1,26 Fa <sup>a</sup>	8,22 ± 3,95 Fa <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas (p < 0,05).

**Tabela 6.** Atividade quelante de cobre (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamaritii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamaritii		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	83,30 ± 0,66 Aa <sup>a</sup>	82,51 ± 0,57 Aa <sup>a</sup>	83,83 ± 1,66 Aa <sup>a</sup>	80,76 ± 6,63 Aa <sup>a</sup>
<b>25</b>	83,20 ± 1,02 Aa <sup>a</sup>	82,73 ± 0,09 Aa <sup>a</sup>	83,48 ± 1,03 Aa <sup>a</sup>	82,17 ± 1,13 Aa <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	75,41 ± 5,63 Aa <sup>a</sup>	82,31 ± 0,7 Aa <sup>a</sup>	78,89 ± 0,47 Aa <sup>a</sup>	77,70 ± 6,70 ABa <sup>a</sup>
<b>6,25</b>	81,19 ± 0,05 Aa <sup>a</sup>	82,48 ± 2,16 Aa <sup>a</sup>	75,04 ± 1,13 Aa <sup>a</sup>	77,01 ± 5,84 ABa <sup>a</sup>
<b>3,12</b>	75,38 ± 1,27 Aa <sup>a</sup>	79,68 ± 2,21 Aa <sup>a</sup>	74,34 ± 1,08 Aa <sup>a</sup>	69,00 ± 0,87 Ba <sup>b</sup>
<b>1,56</b>	57,71 ± 1,34 Bb <sup>a</sup>	65,28 ± 5,93 Ba <sup>a</sup>	41,21 ± 3,43 Bb <sup>b</sup>	54,96 ± 4,75 Ca <sup>b</sup>
<b>0,78</b>	30 ± 0,75 Ca <sup>a</sup>	36,41 ± 1,28 Ca <sup>a</sup>	22,77 ± 2,03 Ca <sup>a</sup>	27,37 ± 1,72 Da <sup>b</sup>
<b>0,39</b>	8,13 ± 1,31 Db <sup>a</sup>	18,77 ± 3,10 Da <sup>a</sup>	12,48 ± 1,89 Ca <sup>a</sup>	18,49 ± 0,8 Da <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas (p < 0,05).

**Tabela 7.** Atividade anti-hipertensiva (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamaritii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Queijo Tamaritii		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	72,33 ± 0,54 Aa <sup>a</sup>	51,28 ± 0,72 Ab <sup>a</sup>	60,51 ± 1,61 Aa <sup>b</sup>	46,94 ± 1,66 Ab <sup>a</sup>
<b>25</b>	62,61 ± 0,49 Ba <sup>a</sup>	48,78 ± 0,27 ABb <sup>a</sup>	46,18 ± 1,34 Ba <sup>b</sup>	46,18 ± 1,23 ABA <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	56,97 ± 0,31 BCa <sup>a</sup>	43,72 ± 0,31 ABCb <sup>a</sup>	45,33 ± 0,31 Ba <sup>b</sup>	44,66 ± 0,27 ABA <sup>a</sup>
<b>6,25</b>	47,93 ± 0,40 CDa <sup>a</sup>	39,78 ± 0,40 BCDB <sup>a</sup>	31,81 ± 0,40 Ca <sup>b</sup>	37,25 ± 0,36 Ba <sup>a</sup>
<b>3,12</b>	44,70 ± 0,58 DEa <sup>a</sup>	36,24 ± 0,63 CDB <sup>a</sup>	30,91 ± 1,48 Ca <sup>b</sup>	24,91 ± 0,49 Cb <sup>b</sup>
<b>1,56</b>	35,97 ± 0,90 Ea <sup>a</sup>	33,01 ± 0,54 DEa <sup>a</sup>	23,88 ± 0,54 CDa <sup>b</sup>	15,10 ± 2,78 Db <sup>b</sup>
<b>0,78</b>	26,57 ± 0,45 Fa <sup>a</sup>	25,67 ± 0,18 Ea <sup>a</sup>	18,10 ± 0,22 Da <sup>b</sup>	13,40 ± 2,51 Da <sup>b</sup>
<b>0,39</b>	21,55 ± 0,72 Fa <sup>a</sup>	15,24 ± 0,13 Fb <sup>a</sup>	15,64 ± 0,27 Da <sup>b</sup>	13,40 ± 2,24 Da <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8.** Atividade antimicrobiana (%) dos peptídeos solúveis em água dos queijos produzidos por coagulante de *A. tamarii* URM6599 e de fonte comercial.

Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i>				<i>L. monocytogenes</i>			
	Queijo Tamaríi		Queijo Comercial		Queijo Tamaríi		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	33,93±2,63 Aa <sup>a</sup>	26,94±0,07 Aa <sup>a</sup>	27,91±1,59 Aa <sup>a</sup>	16±0,48 Aa <sup>a</sup>	0	0	0	0
<b>25</b>	33,93±9,83 Aa <sup>a</sup>	15,10±2,80 ABb <sup>a</sup>	34,86±1,98 Aa <sup>a</sup>	0 Bb <sup>b</sup>	0	0	0	0
<b>12,5</b>	18,37±2,36 ABa <sup>a</sup>	5,12±2,53 Bb <sup>a</sup>	0 Bb <sup>b</sup>	0 Bb <sup>b</sup>	0	0	0	0
<b>6,25</b>	3,88±1,80 Ba <sup>a</sup>	0 Bb <sup>b</sup>	0 Bb <sup>b</sup>	0 Bb <sup>b</sup>	0	0	0	0
<b>3,12</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>1,56</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>0,78</b>	0	0	0	0	13,48±2,31 Ba	7,06±1,52 Bb	0	0
<b>0,39</b>	0	0	0	0	24,77±1,73 Aa	22,11±2,84 Aa	0	0
Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	<i>S. typhimurium</i>				<i>S. aureus</i>			
	Queijo Tamaríi		Queijo Comercial		Queijo Tamaríi		Queijo Comercial	
	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa	< 3kDa	< 10 kDa
<b>50</b>	0	0	0	0	49,40±7,05 Aa <sup>a</sup>	51,07±7,43 Aa <sup>a</sup>	46,52±13,07 Ab <sup>a</sup>	60,10±8,01Ba <sup>a</sup>
<b>25</b>	0	0	0	0	34,16±4,61 Aa <sup>a</sup>	27,11±4,36 Ba <sup>a</sup>	19,17±5,12 Ba <sup>b</sup>	21,22±2,05 Ba <sup>a</sup>
<b>12,5</b>	0	0	0	0	14,69±8,07 Ba <sup>a</sup>	26,22±2,43 Ba <sup>a</sup>	19,26±1,16 Ba <sup>a</sup>	10,53±4,16 Aa <sup>b</sup>
<b>6,25</b>	0	0	0	0	8,45±3,98 Bb <sup>a</sup>	22,50±7,36 Ba <sup>a</sup>	1,30±1,47 Ca <sup>a</sup>	0 a <sup>a</sup>
<b>3,12</b>	0 <sup>b</sup>	0	3,01±2,32 Aa <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	5,72±0,59 Ba <sup>a</sup>	13,54±3,11 Ba <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>1,56</b>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4,69±5,04 Aa <sup>a</sup>	9,01±1,46 Aa <sup>a</sup>	0	0	0	0
<b>0,78</b>	2,84±1,07 Ba <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	6,19±1,76 Aa <sup>a</sup>	7,27±1,35Aa <sup>a</sup>	0	0	0	0
<b>0,39</b>	21,80±4,79 Aa <sup>a</sup>	23,00±3,35 Aa <sup>a</sup>	6,10±3,29 Aa <sup>b</sup>	2,88±1,46 Ab <sup>b</sup>	0	0	0	0

Letras maiúsculas diferentes em coluna (concentração), letras minúsculas diferentes em linha (tamanhos) e letras diferentes em exponencial (queijos dentro do mesmo tamanho) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível produzir enzimas coagulantes de leite através do micro-organismo *Aspergillus tamaritii* URM6599;
- Através de ferramentas estatísticas a produção enzimática do micro-organismo foi otimizada para níveis ótimos de acordo com as variáveis utilizadas;
- Nas análises realizadas não foram detectadas a liberação de aflatoxinas pelo micro-organismo;
- Por meio do bioensaio com *Artemia salina* foi constatado que o extrato bruto apresenta baixa toxicidade, entretanto há necessidade de outros estudos com o objetivo de identificar as potenciais substâncias presentes no extrato que influenciaram no resultado;
- As enzimas coagulantes de leite foram parcialmente caracterizadas e demonstraram potencial de uso para produção de queijos;
- Com o extrato enzimático otimizado do micro-organismo foi possível produzir um queijo Minas Frescal caprino;
- Os peptídeos do queijo produzido com o extrato enzimático de *A. tamaritii* URM6599 apresentaram capacidade antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana;
- O queijo Minas Frescal caprino produzido com coagulante comercial pode ser considerado uma fonte de peptídeos biologicamente ativos.