



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LISANDRA AMORIM DE SOUSA MELO

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DO SORO DE
LEITE CAPRINO DA RAÇA TOGGENBURG**

JOÃO PESSOA
2024

LISANDRA AMORIM DE SOUSA MELO

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DO SORO DE
LEITE CAPRINO DA RAÇA TOGGENBURG**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Dra. Tatiane Santi Gadelha

JOÃO PESSOA
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528a Melo, Lisandra Amorim de Sousa.

Análise do potencial antioxidante de hidrolisados do soro de leite caprino da raça Toggenburg / Lisandra Amorim de Sousa Melo. - João Pessoa, 2024.

48 p.

Orientação: Tatiane Santi Gadelha.

TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Leite de cabra. 2. Hidrólise. 3. Peptídeos bioativos. 4. Estresse Oxidativo. 5. Biologia. I. Gadelha, Tatiane Santi. II. Título.

UFPB/CCEN

CDU 57(043.2)

LISANDRA AMORIM DE SOUSA MELO

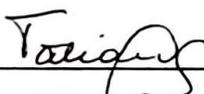
**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DO SORO DE
LEITE CAPRINO DA RAÇA TOGGENBURG**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba.

Data: 10/05/2024

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Tatiane Santi Gadelha, Doutora, UFPB



Maria Isabel Ferreira Campos, Doutora, UFPB



Glaucia Veríssimo Faheina Martins, Doutora, UFPB

Dedico este trabalho às pessoas que me apoiaram nesse sonho, Alessandra e Bianca, mãe e irmã, minhas melhores amigas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente, à Deus por me guiar e me dar forças ao longo da jornada, por me manter firme mesmo em meio as adversidades, por aliviar o meu fardo e tirar as ansiedades do meu coração. Entreguei-Lhe meus planos e Ele os transformou em sonhos realizados.

À minha mãe, minha melhor amiga e companheira, pelo seu incentivo, por sempre me acalmar e estar comigo nos melhores e piores momentos, pelas noites juntas conversando, por sempre me apoiar e me alegrar. Sempre serei grata a você. Também à minha irmã, a pessoa que mais amo no mundo, agradeço por todo o apoio e alegria que você me traz, você é meu sol diário, minha parceira da vida. Sou grata a Deus por suas vidas. Agradeço à toda a minha família, em especial ao meu pai, à Lídia, ao meu irmão Lucas e aos meus avós, Marinez e Fernando, por todo o amor e cuidado que têm por mim. Vocês foram fundamentais para quem eu me tornei hoje.

À minha orientadora, professora Tatiane Santi Gadelha, por todo o cuidado e paciência que teve comigo ao longo dos anos em seu laboratório. Agradeço por toda orientação nos trabalhos e na vida. Você foi essencial para a minha formação acadêmica, obrigada por toda a aprendizagem ao longo desses três anos. Também a professora Ângela Menegatti que, além da orientação e auxílio, permitiu-me também ser monitora, onde descobri minha paixão por lecionar. Ainda, agradeço às professoras Leonor e Juliana Lovo pelos períodos de estágio, na qual, além do aprendizado, permitiu-me mudar meus horizontes.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Paulo, Beethoven, Clara e todos que passaram pelo LQPP, por toda cooperação e parceria, vocês tornaram o cotidiano no laboratório mais alegre. Agradeço também à Karol e, especialmente, à Maria Isabel, por todo o auxílio, ensinamento e orientação no laboratório.

Agradeço aos amigos que a UFPB me deu, Victória, Raquel, Vinicius, Henrique, Bia, Fábio, Clarisse, Clara, Luiz, Mila e todos que já passaram por mim nessa caminhada, seja fazendo um trabalho, conversando ou almoçando juntos. Vocês foram especiais na minha caminhada acadêmica e a tornaram mais leve e divertida. Às minhas amigas da igreja, Carol, Ana Julia, Paula, Luiza, Rafaela, Esther, Sara, Malu e todas que estiveram comigo em conexões. Pude compartilhar com vocês mais do que a minha vida, mas também a minha fé e meus sonhos, vocês são um apoio fundamental para mim. Agradeço, ainda, aos meus amigos Roberta, Jorge e Nathália, com quem compartilhei boa parte da vida.

Por fim, agradeço a todos que puderam participar da realização desse sonho, direta ou indiretamente, e que passaram pela minha vida ao longo desses anos.

RESUMO

O leite caprino tem sido estudado por seu potencial na promoção da saúde, sendo uma fonte promissora de peptídeos bioativos. No organismo humano, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio causa o estresse oxidativo, que está associado ao envelhecimento e doenças degenerativas. Peptídeos bioativos obtidos a partir do soro de leite caprino apresentam propriedades multifuncionais, modulando respostas biológicas, como a antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo. Assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar capacidade antioxidante de hidrolisados do soro de leite caprino da raça Toggenburg, obtidos com diferentes enzimas e tempos de reação. O soro de leite foi obtido a partir da precipitação isoelétrica do leite caprino maduro. As proteínas solúveis foram analisadas pelo método de Bradford e a solubilidade foi verificada em diferentes pH. Posteriormente, a amostra foi submetida a uma hidrólise enzimática com pepsina ou tripsina por 30 min ou 60 min e o grau de hidrólise foi analisado pelo método de ortoftaldeído e pelo método do TCA-nitrogênio solúvel. Ainda, a concentração de aminoácidos livres do soro de leite e dos hidrolisados foi verificada e o perfil proteico foi determinado por SDS-PAGE. A análise da atividade antioxidante ocorreu pelo método de captura do radical ABTS e DPPH, pelo poder de redução total e pela indução do estresse oxidativo em eritrócitos humanos. Assim, o concentrado proteico do soro de leite obtido apresentou um teor de proteínas solúveis de 46% e uma melhor solubilidade no pH 7. A hidrólise enzimática do concentrado proteico do soro de leite gerou quatro hidrolisados, observando-se melhores grau de hidrólise nas amostras com tempo de reação de 60 min para ambas as enzimas. Na SDS-PAGE, foi possível identificar as proteínas do soro de leite, como imunoglobulinas (149 kDa), β -lactoglobulina (13 kDa) e α -lactoalbumina (9 kDa), estimar seu peso molecular e verificar a hidrólise. Além disso, o tratamento da amostra com pepsina por 60 min foi mais efetivo na liberação de aminoácidos livres e na atividade antioxidante pela captura dos radicais ABTS e DPPH. As amostras apresentaram ação oxidante na hemoglobina considerada elevada, porém, quanto a ação antioxidante na hemoglobina, todos os hidrolisados inibiram significativamente o agente oxidante fenilhidrazina. Dessa forma, o soro de leite caprino da raça Toggenburg conseguiu gerar peptídeos bioativos com atividade antioxidante significativas, podendo-se considerar sua aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica.

PALAVRAS-CHAVE: leite de cabra; hidrólise; peptídeos bioativos; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Goat milk has been studied for its potential to promote health, being a promising source of bioactive peptides. In the human body, excessive production of reactive oxygen species causes oxidative stress, which is associated with aging and degenerative diseases. Bioactive peptides obtained from goat whey have multifunctional properties, modulating biological responses, such as antioxidant, reducing oxidative stress. Thus, the present work aims to verify the antioxidant capacity of Toggenburg goat whey hydrolysates, obtained with different enzymes and reaction times. Whey was obtained from isoelectric precipitation of mature goat milk. Soluble proteins were analyzed using the Bradford method and solubility was verified at different pH. Subsequently, the sample was subjected to enzymatic hydrolysis with pepsin or trypsin for 30 min or 60 min and the degree of hydrolysis was analyzed by the orthophthaldehyde method and the TCA-soluble nitrogen method. Furthermore, the concentration of free amino acids in whey and hydrolysates was verified and the protein profile was determined by SDS-PAGE. The analysis of antioxidant activity occurred using the ABTS and DPPH radical capture method, through the total reduction power and the induction of oxidative stress in human erythrocytes. Thus, the whey protein concentrate obtained had a soluble protein content of 46% and better solubility at pH 7. The enzymatic hydrolysis of the whey protein concentrate generated four hydrolysates, with a better degree of hydrolysis in the samples. with a reaction time of 60 min for both enzymes. In SDS-PAGE, it was possible to identify whey proteins, such as immunoglobulins (149 kDa), β -lactoglobulin (13 kDa) and α -lactalbumin (9 kDa), estimate their molecular weight and verify hydrolysis. Furthermore, treating the sample with pepsin for 60 min was more effective in releasing free amino acids and in antioxidant activity by capturing ABTS and DPPH radicals. The samples presented oxidizing action on hemoglobin considered high, however, regarding the antioxidant action on hemoglobin, all hydrolysates significantly inhibited the oxidizing agent phenylhydrazine. In this way, Toggenburg goat whey was able to generate bioactive peptides with significant antioxidant activity, which could be considered for application in the food and pharmaceutical industries.

KEYWORDS: goat milk; hydrolyses; bioactive peptides; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Rebanho caprino de Toggenburg, no Cariri da Paraíba, Brasil..... | 15 |
| Figura 2 – Caprino leiteiro da raça Toggenburg..... | 16 |
| Figura 3 – Formação de EROs e os mecanismo de defesas que neutralizam essas moléculas nas mitocôndrias..... | 21 |
| Figura 4 – Processo de formação da metahemoglobina durante o estresse oxidativo..... | 22 |
| Figura 5 – Solubilidade do soro de leite caprino em diferentes pH..... | 32 |
| Figura 6 – Concentração de aminoácidos livres do soro de leite caprino e dos hidrolisados com tripsina e pepsina, por 30 min e 60 min..... | 35 |
| Figura 7 – Perfil proteico do soro de leite caprino e verificação do peso molecular a partir da mobilidade relativa da SDS-PAGE..... | 36 |
| Figura 8 – Identificação do perfil proteico do soro de leite caprino da raça Torggenburg por meio da SDS-PAGE..... | 37 |
| Figura 9 – Atividade de captura do radical ABTS, em preto, e do radical DPPH, em cinza, do soro de leite caprino e hidrolisados com tripsina e pepsina, por 30 min e 60 min..... | 38 |
| Figura 10 – Ação oxidante das amostras de concentrado proteico do soro (CP Soro) e seus hidrolisados pela formação de metahemoglobina. Controle negativo da hemoglobina (C-) e fenilhidrazina (C+)..... | 39 |
| Figura 11 – Ação antioxidante do concentrado proteico do soro (CP Soro) e dos seus hidrolisados sobre a oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina (C+)..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Diferentes tratamentos o qual o concentrado proteico do soro de leite caprino da raça Toggenburg foi submetido para hidrólise..... | 27 |
| Tabela 2 – Grau de hidrólise obtido pelos métodos OPA e TCA-NS..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -La - α -lactoalbumina

β -Lg - β -lactoglobulina

ABTS – 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

AlbS – Albumina sérica

BSA – Albumina sérica bovina

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

ERO – Espécie Reativa do Oxigênio

Hb – Hemoglobina

Ig – Imunoglobulinas

Lf – Lactoferrina

Lp – Lactoperoxidase

metHb – Metahemoglobina

OPA - Ortoftaldeido

PrP – Protease/peptonas

SDS-PAGE - Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 15 |
| 2.1. Caprinocultura Leiteira..... | 15 |
| 2.2. O Leite Caprino..... | 17 |
| 2.3. Proteínas do Soro de Leite..... | 18 |
| 2.4. Estresse Oxidativo..... | 20 |
| 2.5. Peptídeos Bioativos..... | 22 |
| 2.6. Peptídeos Antioxidantes..... | 23 |
| 3. OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 25 |
| 3.2. Objetivo específico..... | 25 |
| 4. METODOLOGIA..... | 26 |
| 4.1. Obtenção do leite caprino e local execução..... | 26 |
| 4.2. Preparação das amostras do soro de leite caprino..... | 26 |
| 4.3. Determinação do teor de proteínas solúveis..... | 26 |
| 4.4. Solubilidade..... | 27 |
| 4.5. Hidrólise enzimática..... | 27 |
| 4.5.1. Grau de Hidrólise pelo método OPA..... | 28 |
| 4.5.2. Grau de Hidrólise pelo método TCA – N solúvel..... | 28 |
| 4.6. Concentração de Aminoácidos Livres..... | 28 |
| 4.7. Identificação do perfil proteico..... | 28 |
| 4.8. Atividade antioxidante..... | 29 |
| 4.8.1. Método de captura do radical ABTS..... | 29 |
| 4.8.2. Método de captura do radical DPPH..... | 29 |
| 4.8.3. Poder de redução total..... | 29 |
| 4.8.4. Ensaio de estresse oxidativo sobre eritrócitos humanos..... | 30 |
| 4.9. Análise estatística..... | 31 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 5.1. Proteínas solúveis e solubilidade..... | 32 |
| 5.2. Hidrólise enzimática..... | 33 |
| 5.3. Concentração de aminoácidos livres..... | 34 |
| 5.4. Identificação das proteínas do soro e dos peptídeos obtidos por hidrólise..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 5.5. Atividade antioxidante pelos métodos ABTS E DPPH..... | 37 |
| 5.6. Ação oxidante e antioxidante sobre a hemoglobina de eritrócitos humanos..... | 39 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 42 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

1. INTRODUÇÃO

O leite caprino é um alimento de alto valor nutricional por fornecer uma quantidade significativa de macro- e micronutrientes como carboidratos, proteínas, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas. É tradicionalmente utilizado como um substituto ao leite bovino por apresentar menor alergenicidade e maior digestibilidade (NCUBE et al, 2024; NAYIK et al, 2022; PROSSER, 2020).

Uma das raças de caprinos leiteiros bastante difundidas no Brasil é raça Toggenburg. Além desse caprino possuir uma alta adaptabilidade, o leite produzido pela Toggenburg possui algumas vantagens sobre os demais leites caprinos, como menor possibilidade de apresentar reatividade cruzada alérgica com o leite bovino, menor teor de gordura e alta produção de leite (MANSOR et al, 2023; MOHSIN et al, 2019; OLIVEIRA et al, 2011).

Uma das porções conhecidas do leite caprino é o soro de leite, que é constituído por uma mistura heterogênea de proteínas. O soro de leite é rica fonte de peptídeos bioativos, sequências de aminoácidos que podem ser liberadas por fermentação ou processos enzimáticos e desempenhar inúmeras atividades biológicas. Com o aumento na busca por esses peptídeos, especialmente derivados de fontes naturais, o soro de leite caprino tem apresentado grande potencial (KRUNIC & RAKIN, 2022; CHAKRABARTI et al, 2018, CAMPOS et.al, 2022).

Vários estudos têm demonstrado a natureza multifuncional de peptídeos obtidos a partir do soro de leite, podendo desempenhar diferentes atividades biológicas, como a antimicrobiana, a imunomoduladora, a anti-inflamatória, a antioxidante, a anti-hipertensiva, entre muitas outras, sendo capazes de interagir no organismo e modular inúmeras respostas (SANSI et al, 2023; CHAKRABARTI et al, 2018; MARCONE et al, 2017).

Os peptídeos bioativos obtidos a partir do soro de leite caprino têm sido relatados com alta capacidade antioxidante, podendo atuar inibindo a cadeia reacionária do oxigênio (NCUBE et al, 2024; CHAKRABARTI et al, 2018). Esses peptídeos antioxidante possuem em sua estrutura peptídica mais grupos ionizáveis e maior exposição de grupos hidrofóbicos, permitindo que desencadeiam reações de oxirredução e inativam as espécies reativas do oxigênio (CAMPOS et al, 2022; ATHIRA et al, 2014).

As espécies reativas do oxigênio são moléculas instáveis, que contêm elétrons não pareados. Sua produção é um processo natural no organismo, que ocorre em pequenas quantidades através do metabolismo aeróbico ou de processos inflamatórios, porém, em situações de estresse fisiológico, ocorre um aumento na produção dessas moléculas, causando estresse oxidativo (JAKUBCZYK et al, 2020; ATHIRA et al, 2014).

Devido à instabilidade das espécies reativas do oxigênio, essas moléculas atacam outras, como DNA, lipídeos de membrana ou proteínas, causando danos que podem induzir a diferenciação celular e apoptose. Esse mecanismo pode contribuir para a aceleração do processo de envelhecimento e no surgimento de doenças degenerativas e câncer (JAKUBCZYK et al, 2020; ATHIRA et al, 2014).

Uma forma de reduzir o estresse oxidativo é o consumo de antioxidantes dietéticos, que diminuem a concentração de EROs no organismo (MARCONE et al, 2017). Assim, esse trabalho buscou obter e caracterizar hidrolisados a partir do soro de leite caprino da raça Toggenburg e avaliar o seu potencial antioxidante.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Caprinocultura Leiteira

A caprinocultura leiteira é uma atividade agropecuária de criação de cabras (*Capra hircus*) para a produção de leite. As cabras foram um dos primeiros animais a serem domesticados, ainda na Mesopotâmia por volta de 8.000 a.C. e ao longo dos séculos, o leite caprino e os seus produtos derivados providenciaram à humanidade bem-estar econômico e nutricional em todo o mundo (NAYIK et al, 2022).

A pecuária de pequenos ruminantes é uma atividade bastante utilizada em regiões áridas e semiáridas do planeta, especialmente em países em desenvolvimento, devido à boa adaptação da espécie mesmo em condições extremas e irregulares, sendo uma estratégia para melhoria de renda dos seus produtores (CAMPOS et al, 2022; FEITOSA et al, 2020). Devido às características do clima semiárido, a região do Nordeste brasileiro é um ambiente propício à criação de cabras (Figura 1), sendo importante para o desenvolvimento econômico local por meio da agricultura familiar e de pequenos produtores (CAMPOS et al, 2022; FEITOSA et al, 2020).

Figura 1 – Rebanho caprino de Toggenburg, no Cariri da Paraíba, Brasil.



Fonte: EMPAER, 2022.

O Nordeste concentra 70% da produção de leite de cabra do Brasil. Nessa região, ocorre principalmente o incentivo do governo federal para a caprinocultura leiteira, em que o governo compra o leite caprino produzido, de forma que fortalece os agricultores, e o distribui para a população em risco alimentar (BARBOSA, 2021). O estado da Paraíba tem se

destacado como um dos maiores produtores de caprinos leiteiros do Brasil, sendo essa produção impulsionada pelas adequações das técnicas de manejo, incremento da tecnologia, melhoria genética dos rebanhos e apoio de programas governamentais (BARBOSA, 2021; SOUZA et al, 2011). Na caprinocultura da Paraíba, as principais raças leiteiras utilizadas são a Saanen, a Toggenburg e a Parda Alpina (OLIVEIRA et al, 2011).

O leite caprino pode ser processado em inúmeros produtos na indústria alimentícia, podendo ser utilizado na produção de queijos, iogurtes, requeijão, cremes e até mesmo sorvetes, ou, ainda, ser consumido na forma líquida, como em leites pasteurizados ou UHT ou bebidas lácteas (NAYIK et al, 2022; SOUZA et al, 2011). Na Paraíba, o leite de cabra é tradicionalmente consumido, especialmente por idosos e crianças com intolerância ao leite bovino e pela população rural. Há também diversos projetos que buscam o desenvolvimento, fabricação e comercialização de produtos diferenciados derivados de leite de cabra, como queijos finos, iogurtes saborizados e licores (SOUZA et al, 2011).

A raça de caprinos Toggenburg é uma raça rústica e com alta adaptabilidade. Originada na Suíça, foi bem difundida em vários outros países, como o Brasil, devido a sua alta aptidão produtiva (OLIVEIRA et al, 2011). Os animais apresentam pelagem longa e castanha, com duas faixas brancas contínuas na cabeça, que seguem da inserção dos chifres até a boca, como pode ser observado na Figura 2. As fêmeas adultas possuem características morfológicas de um animal leiteiro, como veia mamária volumosa, úbere bem inserido e tetos simétricos, com lactação durando entre 250 e 590 dias e produzindo, em média, 1000 kg de leite por lactação (SENAR, 2020; OLIVEIRA et al, 2011).

Figura 2 – Caprino leiteiro da raça Toggenburg.



Fonte: SENAR, 2020.

O leite de cabras Toggenburg não variam significativamente de outras raças quanto ao conteúdo de proteínas ou carboidratos. Contudo, apresentam um baixo teor de lipídeos e uma menor concentração de ácidos graxos saturados em sua composição, sendo um leite menos gorduroso (MOHSIN et al, 2019). Ainda, estudos de Mansor e colaboradores (2023), ao comparar três raças de caprinos, demonstraram que o leite de cabra Toggenburg tem uma menor chance de apresentar reatividade cruzada alérgica, quando o sistema imunológico identifica as proteínas do leite caprino como semelhantes ao leite bovino e desencadeia a alergia. Dessa forma, caprinos da raça Toggenburg trazem inúmeras vantagens devido à alta produção de leite que essas cabras conseguem manter e pelas características nutritivas do leite produzido.

2.2. O Leite Caprino

O leite é o principal alimento fornecido aos neonatos de mamíferos. Sendo sintetizado e secretado pelas glândulas mamárias de fêmeas, é um marco na evolução desse grupo. A sua síntese, conhecida como lactogênese, acontece a partir de nutrientes, como glicose, aminoácidos e ácidos graxos, fornecidos pelo sangue para as células da glândula mamária e que irão servir de substrato. A lactogênese ocorre em resposta a fatores ambientais, hormonais, especialmente pelo aumento na produção de prolactina no início da gestação, e a nutrição materna (KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014; KIM & WU, 2009).

Apesar de diversos fatores influenciarem a sua composição, como genética, raça, estágio de lactação e ambiente, o leite caprino é um alimento de alto valor nutricional. Apresentando uma quantidade significativa de macro- e micronutrientes como carboidratos, proteínas, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas em quantidades mais elevadas do que em outros leites, o leite caprino na dieta humana traz inúmeros benefícios, especialmente como um substituto ao leite bovino (NAYIK et al, 2022; PROSSER, 2020; KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014).

O leite caprino apresenta micelas de lipídeos de menor tamanho, diferindo de outros tipos de leites, o que é determinante para sua maior absorção no organismo. Além disso, o leite caprino contém uma menor concentração de lactose e da proteína relacionada à alergia, a caseína $\alpha 1$, conferindo a este leite uma menor alergenicidade e maior digestibilidade quando comparado com o leite bovino (NAYIK et al, 2022).

A lactose é o mais comum e abundante carboidrato presente no leite, sendo variável de acordo com o estado de lactação. O leite caprino apresenta também altas concentrações de

outros oligossacarídeos com perfil similar ao do leite humano (GARCIA E TRAVASSOS, 2012).

O conteúdo de lipídeos é o componente mais variável do leite. O leite caprino apresenta um alto conteúdo de ácidos graxos essenciais, como ácido linoleico e araquidônico. O leite caprino apresenta ácidos graxos de cadeia média, como os ácidos capríco, caprílico e cáprico, e de cadeia curta, correspondendo juntos a quase 30% do conteúdo de ácidos graxos do leite. O odor e sabor diferenciado do leite caprino se deve na sua maioria a esse conteúdo de ácidos graxos de cadeia média e curta (NAYIK et al, 2022; CAMPOS et al, 2022).

As proteínas do leite se diferem em dois grupos, as caseínas, que correspondem a cerca de 80% do conteúdo proteico do leite, e as proteínas do soro, presentes em menor concentração (ALVES et al, 2014). As caseínas são proteínas fosforiladas que se apresentam na forma de micelas. Devido ao polimorfismo genético, as caseínas variam consideravelmente em sua estrutura e se dividem nas subunidades α_1 , α_2 , β e κ , sendo a caseína β um componente crucial do leite, correspondendo a aproximadamente 55% do total de caseínas. (NAYIK et al, 2022; KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014).

O soro de leite corresponde cerca de 20% do conteúdo proteico do leite caprino. Sua constituição básica é 94% de água e apenas 0,45% de proteínas, além de conter lactose, vitaminas e minerais em sua composição. Na indústria alimentícia, o soro de leite é um subproduto resultante da fabricação de queijos. Estima-se que na produção de 1 kg de queijo são obtidos 9 kg de soro, representando cerca de 90% do volume de leite utilizado. Em larga escala, há uma problemática envolvendo esse subproduto, devido à extensa carga orgânica que é gerada, sendo muitas vezes descartada (NAYIK et al, 2022; PITHAN E SILVA; BUENO; SÁ, 2017).

Contudo, o soro de leite tem um alto valor nutricional, sendo uma importante fonte proteica para o consumo, além de apresentam diversas propriedades funcionais tecnológicas e bioativas, permitindo seu uso como ingrediente para a indústria alimentícia ou farmacêutica, ou como um produto nutracêutico (KRUNIC & RAKIN, 2022; PITHAN E SILVA; BUENO; SÁ, 2017).

2.3. Proteínas do Soro de Leite Caprino

O soro de leite caprino é uma mistura heterogênea de várias proteínas individuais, que podem ser separadas em dois grupos: as proteínas majoritárias, β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactoalbumina (α -La), presentes em maiores concentrações no soro, e as proteínas

minoritárias, que incluem imunoglobulinas (Ig), albuminas séricas (AlbS), lactoferrina (Lf), lactoperoxidase (Lp) (CAMPOS et al, 2022).

A proteína mais abundante no soro é a β -Lg, correspondendo a quase 50% do conteúdo proteico do soro de leite. É constituída por 162 resíduos de aminoácidos, cuja conformação apresenta 9 segmentos de folhas β antiparalelas, que se arranjam na forma de um cálice (NAYIK et al, 2022; CAMPOS, 2018). Apresenta-se normalmente como dímero com subunidades iguais unidas por duas pontes dissulfeto (LOCH et al, 2014). Nayik e colaboradores (2022) explicam que a sequência de aminoácidos da β -Lg caprina se difere da bovina apenas por seis posições, inclusive em ambos os resíduos terminais, essa pequena diferença é suficiente para lhe conferir menor estabilidade à desnaturação.

A α -La representa aproximadamente 10% do conteúdo proteico do soro de leite caprino, sendo sintetizada na glândula mamária apenas durante a gravidez ou no período de lactação. Pela sua capacidade de se ligar a íons metálicos, é classificada como uma metaloproteína, cuja estrutura globular é constituída por 123 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica com quatro pontes dissulfetos (NAYIK et al, 2022; CAMPOS, 2018; KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014).

Entre outras proteínas presentes no soro de leite, encontramos as imunoglobulinas, especialmente as IgA, IgG e IgM, que são proteínas não específicas do leite, sendo encontradas e produzidas fora das glândulas mamárias e do período de lactação. Essas proteínas são componentes bioativos do leite, atuando em conjunto ao sistema imune do organismo. A presença dessas proteínas está relacionada ao período de lactação do animal, sendo observada uma maior concentração durante a fase colostro do leite (>30 dias de lactação) do que na fase madura, pois nessa etapa é conferida a imunidade passiva ao neonato por meio da amamentação, protegendo as mucosas do neonato e formando imunidade bacteriana (NAYIK et al, 2022; VOLOSHYNA et al, 2021; CAMPOS, 2018; KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014).

A lactoferrina é uma glicoproteína pertencente à família das transferrinas. Está envolvida em diversas atividades biológicas, como antioxidante, ligação de íons metálicos, antibacterianas e imunomoduladoras, conferindo a proteína um importante papel na homeostase do ferro e proliferação celular (NAYIK et al, 2022; VOLOSHYNA et al, 2021). Nayik e colaboradores (2022) evidenciam que a lactoferrina caprina possui características funcionais coerentes com a lactoferrina humana, sendo, inclusive, considerada a melhor escolha para suplementação.

Além dessas proteínas, o perfil proteico do soro do leite caprino é composto, em menores concentrações, por albumina sérica, lactoperoxidases, proteoses e peptonas e peptídeos da caseína. A sua composição, é marcada pela presença dos aminoácidos essenciais, como fenilalanina, tirosina, triptofano, cisteína, isoleucina e lisina, em quantidades acima da recomendada (CAMPOS et al, 2022).

2.4. Estresse Oxidativo

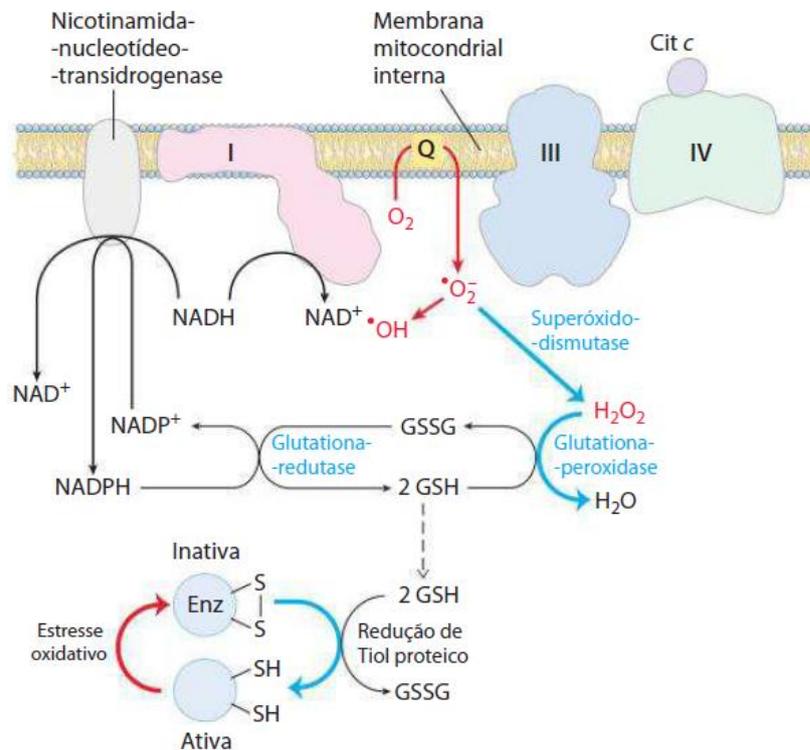
A oxidação é um processo biológico essencial na geração de energia dos organismos vivos, porém diversas etapas desse processo oxidativo têm potencial de produzir espécies reativas do oxigênio (ERO), que são, especialmente, o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet), o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KHAN et al, 2019; NELSON & COX, 2014). Essas moléculas são importantes nos processos de produção de energia, de fagocitose e apoptose, além de serem sinalizadores para as células, induzindo ajustes metabólicos (SIES & JONES, 2020; NELSON & COX, 2014).

As espécies reativas do oxigênio possuem elétrons não pareados, que as torna altamente reativas, de forma que se ligam rapidamente a outros compostos, capturando ou entregando seu elétron. Nesse processo, a ERO fica estável, porém a molécula atacada é transformada em um radical, iniciando uma reação em cadeia (JAKUBCZYK et al, 2020; SIES & JONES, 2020).

Apesar das células possuírem mecanismos para neutralizar as espécies reativas, como é observado na Figura 3, inevitavelmente algumas escapam dessas defesas, assim como algumas situações, como processos inflamatórios, estresse fisiológico ou dietas inadequadas, podem levar a um drástico aumento na produção dessas moléculas, causando estresse oxidativo (JAKUBCZYK et al, 2020; NELSON & COX, 2014).

As EROs podem causar sérios danos celulares, pois reagem com as macromoléculas, oxidando proteínas, lipídeos, DNA e RNA. Esses danos implicam no envelhecimento e uma quantidade considerável de doenças, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (MARCONE et al, 2016). A oxidação pode impactar, inclusive, a indústria alimentícia, pois a oxidação dos alimentos é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, diminuindo o tempo de vida dos produtos (SILVA, 2021).

Figura 3 – Formação de ERO e os mecanismos de defesas que neutralizam essas moléculas nas mitocôndrias.

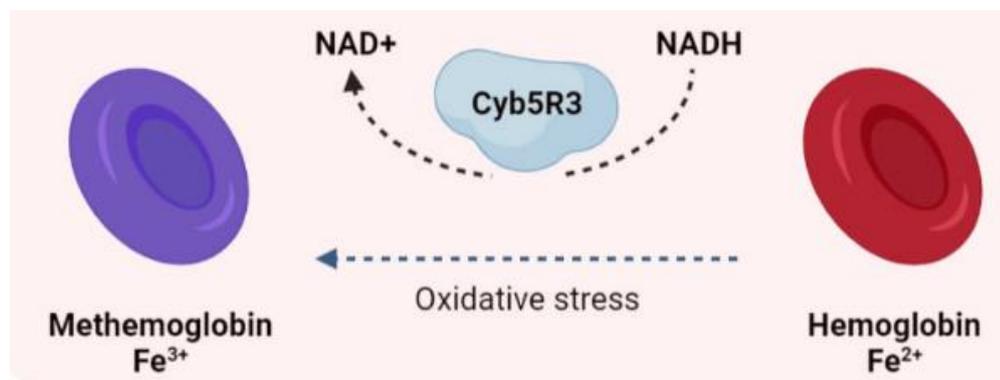


Fonte: NELSON & COX, 2014.

Em eritrócitos humanos, o estresse oxidativo pode levar a formação de complexos metálicos e produtos da desnaturação da hemoglobina, que podem causar anormalidades, afetar a funcionalidade da célula e contribuir para a destruição prematura do eritrócito (ACHILLE et al, 2021; CLARO et al, 2006).

Os eritrócitos humanos são células sanguíneas únicas e especializadas no transporte de oxigênio entre os pulmões e os demais tecidos do corpo (ACHILLE et al, 2021; ARBOS et al, 2008). Essas células possuem uma proteína que é responsável por esse transporte, a hemoglobina (Hb), que apresenta em sua estrutura um grupo heme contendo um íon ferroso (Fe^{2+}), que coordena a ligação com o oxigênio. Em situações de estresse oxidativo, a hemoglobina é oxidada em metahemoglobina (metHb), na qual o íon se apresentará na forma férrica (Fe^{3+}), como é demonstrado na Figura 4, tornando-se incapaz de ligar ao oxigênio e afetando drasticamente a funcionalidade da célula (ACHILLE et al, 2021; FRANCO et al, 2019).

Figura 4 – Processo de formação da metahemoglobina durante o estresse oxidativo.



Fonte: ACHILLE et al, 2021.

2.5. Peptídeos Bioativos

Os peptídeos bioativos são sequências de aminoácidos normalmente curtas, contém entre 3 e 20 aminoácidos, derivadas de proteínas, onde estão presentes de forma inativa. Essas sequências são liberadas das proteínas por meio de processos de fermentação microbiana ou por proteólise (AGYEI et al, 2016; CHAKRABARTI et al, 2014). No sistema digestivo, por exemplo, a geração de peptídeos bioativos através da proteólise por enzimas digestivas, como pepsina e tripsina, pode ocorrer naturalmente, sendo os peptídeos formados absorvidos pelos enterócitos, onde atuarão gerando efeitos sistêmicos no organismo (MARCONE et al, 2016).

Os peptídeos bioativos desencadeiam diversas atividades fisiológicas, podendo inclusive apresentar multifuncionalidades em uma mesma sequência, e desempenhar mais de uma atividade biológica (AGYEI et al, 2016). Em peptídeos derivados do leite caprino obtidos por hidrólise enzimática, por exemplo, foram relatadas inúmeras atividades biológicas, como propriedades antioxidantes, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e antidiabética. Essas propriedades atuam diretamente no controle dos fatores de risco, como no controle da insulina ou da pressão sanguínea, minimizando seus efeitos sistêmicos e promovendo a saúde do organismo (MARCONE et al, 2016).

Devido a essas propriedades e a necessidade de uma dieta rica em proteínas, vem-se observando um aumento na procura e no desenvolvimento de peptídeos bioativos obtidos de fontes naturais, especialmente derivados de fontes alimentares, como o leite. Alguns estudos apontam peptídeos bioativos derivados de alimentos como uma interessante alternativa a produtos farmacêuticos sintéticos, indicando especialmente para tratamentos e prevenção de doenças crônicas, por promover a ação fisiológica causando menos efeitos adversos ao paciente (CHAKRABARTI et al, 2018; CHAKRABARTI et al, 2014)

Além disso, o uso de peptídeos bioativos também vem ganhando interesse na indústria alimentícia pelo seu uso em alimentos funcionais e nutracêuticos, especialmente devido ao crescimento no interesse nesse tipo de alimento por parte do consumidor nos últimos anos (CHAKRABARTI et al, 2018; CHAKRABARTI et al, 2014). Seja para uso farmacológico, seja para uso alimentício, peptídeos obtidos a partir do soro de leite são comumente relatados com alta capacidade antioxidantes. Mesmo em casos em que o grau de hidrólise da proteína é baixo, ainda são induzidas significantes mudanças estruturais que causam boa atividade antioxidante (EMBIRIEKAH et al, 2017).

2.6. Peptídeos Antioxidantes

A ação das EROs pode ser evitada por meio de antioxidantes, que agem doando elétrons para os radicais livres, bloqueando-os e interrompendo a cadeia reacionária do oxigênio (ATHIRA et al, 2014). O consumo de antioxidantes dietéticos ajuda na inativação dessas moléculas altamente reativas e na redução do estresse oxidativo no organismo (MARCONE et al, 2017; CHACKRABARTI et al, 2014).

Nos alimentos, os antioxidantes são responsáveis por retardar ou inibir o processo de oxidação que diminuem a validade dos produtos (SILVA, 2021). O potencial antioxidante e o mecanismo usado pelos peptídeos antioxidantes para inibir a oxidação tem sido atribuído principalmente ao seu conteúdo de aminoácidos (MARCONE et al, 2017).

Os peptídeos antioxidantes irão possuir alto conteúdo de histidina, que possui capacidade de captura de radicais e quelação de íons, impedindo assim a formação de radicais livres e danos oxidativos celulares. Ainda, a presença de aminoácidos hidrofóbicos na sequência proteica e sua maior exposição após a hidrólise, aumentam a acessibilidade desses peptídeos aos alvos hidrofóbicos. Outra característica observada nos peptídeos antioxidantes é a presença de uma maior quantidade de grupos ionizáveis, que estão relacionados com as reações de oxirredução, auxiliando na neutralização de radicais livres (CAMPOS et al, 2022; MARCONE et al, 2017; ATHIRA et al, 2014).

Devido à complexidade das reações oxidantes nos sistemas biológicos, diferentes métodos podem ser utilizados para avaliar o potencial antioxidante de proteínas e peptídeos. Dentre algumas das análises *in vitro* comumente usadas para avaliar a capacidade antioxidante, observa-se métodos que avaliam a capacidade da amostra de inibir os radicais livres, como os métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS, e métodos que avaliam a capacidade de reduzir íons metálicos, como o Poder de Redução Total (KRUNIC & RAKIN, 2022; CHACKABARTI et al, 2014; RUFINO et al, 2007b).

Uma outra forma de avaliar o potencial antioxidante é pela inibição da formação de metHb. Como abordado anteriormente, a formação de metHb está ligada ao processo de estresse oxidativo no organismo, podendo ser replicado *in vitro* pela adição de agentes oxidativos, como a fenilhidrazina, em uma suspensão de eritrócitos. A presença de proteínas, peptídeos ou vitamina C, pode significativamente reduzir ou prevenir a formação da metHb nos eritrócitos humanos (ARBOS et al, 2008).

Diversos peptídeos antioxidantes obtidos a partir da hidrólise do soro de leite caprino foram identificados, apresentando como principal mecanismo antioxidante a capacidade de inibição dos radicais livres (CAMPOS et al, 2022). A hidrólise das proteínas do soro β -Lg e lactoferrina gerou peptídeos que agiram inibiram significativamente os superóxidos e os radicais hidroxilas (CHACKABARTI et al, 2014). Ainda, fragmentos de peptídeos contendo a sequência WYSLAMAASDI foram relatados apresentando maior atividade antioxidante (MARCONE et al, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar a hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite caprino da raça Toggenburg utilizando diferentes enzimas e tempos de reação, assim como avaliar o potencial antioxidante dos diferentes hidrolisados, a fim de verificar como essas diferenças nas características da hidrólise afetam os hidrolisados.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter o soro de leite caprino por precipitação isoelétrica e caracterizá-lo;
- Realizar a hidrólise das proteínas do soro com diferentes enzimas e diferentes tempos de reação;
- Analisar o grau de hidrólise;
- Avaliar o potencial antioxidante das amostras por diferentes métodos e comparar seus resultados.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção do Leite Caprino e Local Execução

As amostras do leite maduro (>120 dias) foram obtidas por ordenha manual, realizada pela manhã (entre 5 a 6 horas) de um rebanho homogêneo de cabras da raça Toggenburg de criadores da cidade de Coxixola, que distribuem às 7 horas da manhã para a Associação de Caprinocultura do Município de Coxixola/Cariri Paraibano (Latitude: 7° 37' 31" Sul, Longitude: 36° 36' 12" Oeste) do Estado da Paraíba. O transporte das amostras de leite de Coxixola para o Laboratório de Química de Proteínas e Peptídeos, em João Pessoa, foi realizado em garrafas plásticas sob refrigeração, acondicionadas em isopor contendo gelo. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química de Proteínas e Peptídeos (LQPP), do Departamento de Biologia Molecular, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Campus I.

4.2. Preparação das Amostras do Soro de Leite Caprino

As amostras foram filtradas e o desnate foi realizado por centrifugação (5000 rpm / 4 °C / 20 min). O soro do leite foi obtido por precipitação isoelétrica de acordo com a metodologia descrita por Egito et al (2006) com modificações, com o ajuste do pH do leite para pH 4,1 por adição de HCl 1 M, sendo, posteriormente, submetido à centrifugação a frio (5000 rpm / 4 °C / 20 min) para separação da fração da caseína (precipitado) e do soro (sobrenadante). O soro do leite obtido foi filtrado e teve seu pH ajustado para pH 7,0 pela adição de NaOH 1 M. A amostra foi dialisada contra água em membranas de 8 kDa, congelada a -4 °C, liofilizada (-30 °C) e armazenada a 18 ± 2 °C.

4.3. Determinação do Teor de Proteínas Solúveis e Aminoácidos Livres

O teor de proteínas solúveis foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), tendo como padrão a albumina bovina sérica (BSA). A amostra foi diluída em três diluentes diferentes, NaCl 0,15 M, H₂O destilada e em tampão TRIS 0,1 M contendo NaCl 0,15 M. O teor de proteínas solúveis foi obtido a partir da média das absorbâncias das amostras em comprimento de onda de 595 nm multiplicado pela diluição de cada amostra e pelo fator de correlação calculado a partir da proteína padrão.

4.4. Solubilidade

A solubilidade das proteínas do soro de leite foi determinada segundo método descrito por Morr et. al (1985), com modificações, onde foi utilizado 5 mL da amostra do concentrado proteico do soro de leite diluída a 1% em água ultrapura. A análise da amostra foi realizada utilizando valores de pH que variaram de 3,0 a 11,0 com intervalo de 2,0. Após o ajuste do pH, as amostras foram centrifugadas à 6000 rpm por 20 min à 4 °C. Em seguida, foi determinado o teor de proteínas solúveis do sobrenadante pelo método de Bradford (1976). A solubilidade (%) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Teor de proteínas do sobrenadante}}{\text{Teor de proteínas da amostra}} \times 100$$

4.5. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática das proteínas presentes no soro do leite caprino foi realizada por digestão *in vitro* usando duas enzimas separadamente, a tripsina e a pepsina segundo a metodologia de Ahmed et al (2015) com modificações, sendo realizada em uma incubadora shaker com controle de agitação e temperatura. Utilizou-se uma solução de concentrado protéico de soro de leite caprino na concentração de 2% em água ultrapura. O pH das amostras foi ajustado para o pH 7,0 (NaOH 1 M) e pH 2,0 (HCl 1 M) para a hidrólise com tripsina e pepsina, respectivamente.

As soluções de soro do leite caprino a 2% contendo pepsina ou tripsina em razão enzima/substrato de 5% (1:20) foram incubadas a 37 °C por 30 min e 60 min (Tab. 1) com agitação a 200 rpm. Após as hidrólises, as enzimas foram inativadas por aquecimento a 85 °C por 5 min e centrifugadas (5000 rpm /4 °C/ 20 min). Os hidrolisados obtidos foram então dialisados contra água em membranas de 1 kDa, congelados a -4 °C, liofilizados (-30 °C) e armazenados a 18 ± 2 °C para análises posteriores.

Tabela 1 – Diferentes tratamentos o qual o concentrado proteico do soro de leite caprino da raça Toggenburg foi submetido para hidrólise.

| Hidrolisado | Tipo de enzima | Tempo de reação (min) |
|--------------------|-----------------------|------------------------------|
| T30 | Tripsina | 30 |
| T60 | Tripsina | 60 |
| P30 | Pepsina | 30 |
| P60 | Pepsina | 60 |

4.5.1. Grau de Hidrólise pelo Método OPA

O grau de hidrólise foi verificado pelo método ortoftaldeído-OPA (SPELLMAN et al, 2003), com modificações, na qual as amostras foram diluídas em água ultrapura em concentração de 1 mg/mL. Aliquotas de 100 µL de amostra foram adicionados em 700 µL do reagente OPA (Tetraborato de sódio 10 mM, SDS 20%, betamercaptoetanol e o OPA diluído em metanol), realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 340 nm após 2 min de repouso. O grau de hidrólise foi calculado segunda a fórmula:

$$GH (\%) = \frac{\Delta Abs \times 1,934}{Concentração\ proteica} \times 100$$

4.5.2. Grau de Hidrólise pelo Método TCA – N solúvel

Segundo o método TCA – nitrogênio solúvel (SARABANDI et al, 2018), com modificações, adicionou-se TCA 0,44 M (1:1) em 5 mg dos hidrolisados diluídos em 1 mL de água ultrapura, sendo incubados a 18 ± 2 °C por 30 min. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm/10 min) e o sobrenadante foi coletado e analisado segundo a metodologia de Bradford (1976), tendo como padrão a BSA. Para calcular o grau de hidrólise, usou-se da seguinte equação:

$$GH(\%) = \frac{(Teor\ de\ proteína\ (TCA\ +\ Sobrenadante))}{(Teor\ de\ proteína\ (Hidrolisados))} \times 100$$

4.6. Concentração de Aminoácidos Livres

A concentração de aminoácidos livres foi determinada segundo o método colorimétrico da EBC-ninidrina (LIE, 1973), tendo glicina como padrão. As amostras foram diluídas na concentração de 1 mg/mL em água e posteriormente adicionadas ao reagente ninidrina (1:1). Após aquecer por 15 min em banho-maria (85 °C) e esfriar, adicionou-se 5 mL da solução de diluição (iodeto de potássio 0,012 M; etanol a 38,4%) e realizou a leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

4.7. Identificação do Perfil Protéico

O perfil proteico do soro de leite e dos peptídeos obtidos por hidrólise foram identificados e analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (LAEMMLI, 1970). A análise foi realizada usando placas verticais de 1 mm com gel de separação com concentração de 15% de poli(acrilamida), preparado em tampão Tris-HCl 3 M pH 8,8 e SDS a 10%, e gel de empilhamento preparado

na concentração de 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS a 10%. As amostras foram dissolvidas em solução tampão contendo Tris-HCl 0,5M pH 6,8, SDS 10%, glicerol, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol, sendo então incubadas a 100 °C por 10 min e centrifugadas (6000 rpm/1 min). A eletroforese foi conduzida em corrente constante de 30 mA. As bandas proteicas foram visualizadas após coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,005% e descoloração com solução de ácido acético 10%.

4.8. Atividade Antioxidante

4.8.1. Método de Captura do Radical ABTS

A atividade antioxidante foi verificada pelo método de captura do radical ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). O preparo da solução do radical ABTS foi realizado 16h antes do uso, sendo posteriormente diluído em álcool etílico até obter um valor de absorvância de 0,700 (\pm 0,05 nm) a 734 nm. Para o ensaio, 15 μ L de cada amostra a 1% diluída em água foram adicionados a 1,5 mL de solução ABTS diluída e agitada em vórtex. A leitura foi realizada a 734 nm, no escuro, após 6 min de reação da mistura. Como padrão, foi utilizado Trolox como antioxidante de referência (RUFINO et al, 2007a).

4.8.2. Método de Captura do Radical DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Foram adicionados 50 μ L das amostras diluídas em água a 1% em 1,95 mL da solução etanólica DPPH 0,06 mM. As amostras foram mantidas sob agitação por 30 min no escuro e em temperatura ambiente. Após o processo, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 515 nm, utilizando Trolox como padrão (RUFINO et al, 2007b).

4.8.3. Poder de Redução Total

O concentrado proteico do soro e os hidrolisados foram solubilizadas na proporção de 1:2,5:2,5 com tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,6 e Ferricianeto de potássio 1%. A mistura foi incubada a 50 °C por 20 min, e depois adicionou-se TCA 10% na mesma proporção. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min e 1 mL do sobrenadante foi coletado e adicionado a 1 mL de água ultrapura e 200 μ L de uma solução de cloreto de ferro III 1%. Após 10 min, a absorvância foi verificada a 700 nm usando água destilada como branco (KRUNIC & RAKIN, 2022; OYAIZU, 1986).

4.8.4. Ensaio de Estresse Oxidativo sobre Eritrócitos Humanos

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Arbos et al (2008) e Camargo et al (2007), avaliando o potencial oxidante e antioxidante das amostras sobre eritrócitos humanos a partir da conversão de hemoglobina (Hb) em metahemoglobina (metHb). As amostras do soro de leite e dos hidrolisados foram preparadas em tampão PBS [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,123 M), Na_2HPO_4 (0,027 M) e NaCl (0,123 M); pH 7,4] com concentrações de 1 mg/mL. Eritrócitos do sistema ABO foram obtidos por meio de doações de bolsas de sangue de descarte pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley.

Para obtenção dos eritrócitos humanos, 6 mL das amostras de sangue do tipo A foram adicionadas a NaCl 0,15 M, centrifugadas (2000 rpm / 5 min) e o sobrenadante desprezado. A lavagem foi realizada 5 vezes até a obtenção de uma massa de eritrócitos livre de soro e material hemolisado. Os eritrócitos foram, então, preparados a 30% em tampão PBS e glicose 0,2%.

Para verificar a ação oxidante sobre a hemoglobina, adicionou-se 10 μL de Triton X-100 em 2 mL de eritrócitos a 30%, a fim de promover a hemólise e expor a Hb. Posteriormente, foram adicionadas as amostras diluídas (1:1), sendo mantidos sob agitação de 100 rpm a 25°C por 1h. Após esse processo, verificou-se a presença de metHb, na qual retirou 200 μL de cada amostra, homogeneizada em 6 mL de tampão fosfato [NaH_2PO_4 (0,027M) e KH_2PO_4 (0,042M)], em seguida, realizou a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm. Para verificar a Hb, homogeneizou 300 μL da solução anterior em 3 mL de tampão fosfato e realizou a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Para avaliação da atividade antioxidante, em cada tubo das amostras, adicionou-se 100 μL do agente oxidante fenilhidrazina (1 mmol/L). Os tubos contendo as amostras na presença da fenilhidrazina foram aerados com pipeta Pasteur para que houvesse contato do agente com o oxigênio. Após agitação a 100 rpm (25°C) por 20 min, repetiu-se o processo descrito anteriormente para leitura espectrofotométrica da metHb e Hb na presença de fenilhidrazina. Os grupos controles foram: controle negativo (2 mL de sangue + 10 μL de Triton X-100) e controle positivo (2 mL de sangue + 10 μL de Triton X-100 + 100 μL de fenilhidrazina). Para expressão dos resultados, foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{metHb (\% da Hb)} = \frac{\text{Abs } 630\text{nm} \times 100}{\text{Abs } 630 \text{ nm} + (\text{Abs } 540 \text{ nm} \times 10)}$$

4.9. Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e para a análise dos dados foi utilizado o software Graphpad Prisma 6 através da aplicação da Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste One way de múltiplas comparações para obtenção de resultados. Todas as análises foram feitas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

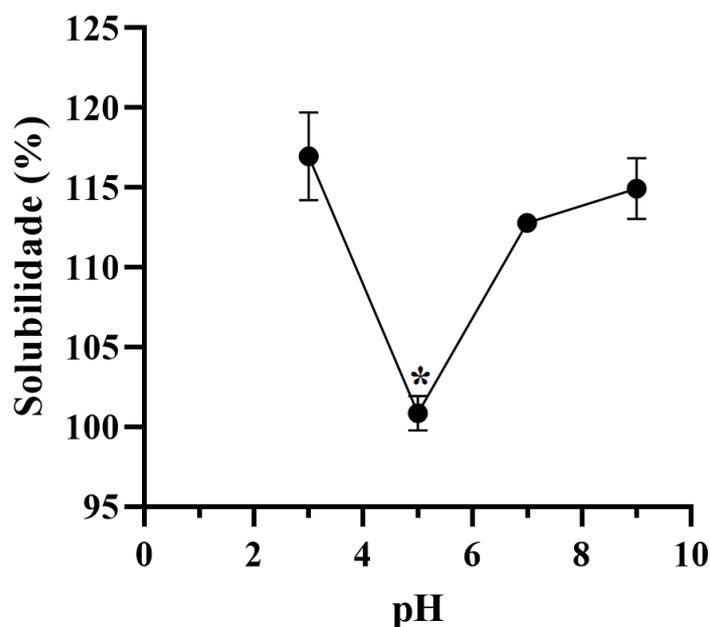
5.1. Proteínas Solúveis e Solubilidade

Após obtenção do concentrado proteico do soro de leite, realizou-se a dosagem das proteínas solúveis do soro de leite diluída em NaCl 0,15 M, obtendo um teor de 0,462 mgP/mL, que equivale a aproximadamente 46% de proteínas solúveis, indicando que o soro apresenta um percentual proteico que pode ser aproveitado pela indústria alimentícia.

Ainda, foram verificados o teor de proteínas solúveis nas amostras diluídas em água destilada e em tampão Tris 0,1 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, que a apresentaram teor de 0,337 mgP/mL e 0,340 mgP/mL de proteínas solúveis, respectivamente, inferiores ao do NaCl 0,15 M. Dessa forma, observa-se que as proteínas do soro de leite Toggenburg necessitam de uma força iônica para sua solubilização, que pode ser evidenciado ao utilizar o NaCl 0,15 M.

A solubilidade das proteínas é um fator importante, pois permite identificar nas amostras o percentual de proteínas disponíveis para interagir com outros compostos e expressar suas propriedades biológicas e funcionais. A Figura 5 mostra a solubilidade do concentrado proteico do soro de leite caprino em diferentes pH.

Figura 5 – Solubilidade do soro de leite caprino em diferentes pH.



Dados com diferenças significativas utilizando-se a análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($p < 0,0005$).

Verifica-se a menor solubilidade em pH 5,0, valor próximo ao ponto isoelétrico da β -lactoglobulina e da α -lactoalbumina, proteínas majoritárias, que correspondem juntas a cerca de 60% do conteúdo proteico do soro (CAMPOS et al, 2022; NAYIK et al, 2022). O ponto isoelétrico de uma proteína é caracterizado pela carga líquida nula, havendo uma menor interação com a água, de forma que as proteínas se agrupam, precipitam e atingem seu ponto mais apolar, com cargas eletrostáticas mínimas, apresentando, conseqüentemente, uma baixa solubilidade (NELSON & COX, 2014).

Os pH 3, 7 e 9, que apresentaram solubilidades maiores ($p < 0,01$) do que o pH 5, não apresentaram diferenças significativas entre si. Em pH mais extremos, como pH 3 ou 9, é possível que ocorram mudanças conformacionais e funcionais das proteínas, devido às alterações em suas cargas pelo aumento nas suas interações eletrostáticas, afetando a estabilidade das ligações de hidrogênio, como evidenciam Li e colaboradores (2020).

Dessa forma, observamos o pH 7,0 como o pH mais adequado para realizar análises com as proteínas do soro, por apresentar uma boa solubilidade e ser uma condição com menor possibilidade de alterações na estrutura das proteínas por ser o pH na qual o leite normalmente se encontra, assim aumentando as possibilidades de permanecerem bioativas (MAGALHÃES et al, 2022).

5.2. Hidrólise Enzimática

A Tabela 2 evidencia os resultados do grau de hidrólise realizado por dois métodos diferentes. Observa-se que em todos os tratamentos, os hidrolisados apresentaram grau de hidrólise maior do que 10%. Agyei e colaboradores (2016) explicam que hidrolisados de proteínas do soro de leite com grau de hidrólise menor que 10% estão relacionados à peptídeos com atividades tecnológicas, como capacidade de formar espumas e emulsificantes. Enquanto hidrolisados com grau de hidrólise superior a 10% vão estar relacionados a peptídeos com atividades biológicas. Dessa forma, é possível que todos os hidrolisados obtidos exerçam atividades biológicas.

Os dados descritos na Tabela 2 demonstram que em ambos os métodos utilizados apresentaram um aumento no grau de hidrólise após os 30 min. Os tratamentos de 60 min com as enzimas tripsina e pepsina obtiveram os melhores grau de hidrólise. Kronic e Rakin (2022) observaram em suas análises com o concentrado proteico do soro de leite bovino, realizando a hidrólise com a enzima tripsina, que o grau de hidrólise aumenta significativamente na primeira hora de tratamento, porém, após esse tempo, é consideravelmente reduzido.

Tabela 2 – Grau de hidrólise obtido pelos métodos OPA e TCA-NS.

| Hidrolisado | GH (%) | GH (%) |
|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| | Método OPA | Método TCA-N solúvel |
| T30 | 33,71 ^c | 18,91 ^d |
| T60 | 50,84 ^a | 22,39 ^b |
| P30 | 22,10 ^d | 21,37 ^c |
| P60 | 39,79 ^b | 23,02 ^a |

*Dados com diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significantes entre os tratamentos pela análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do teste de Tukey com significância de 5%.

Diferentes métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos para a análise do grau de hidrólise, não havendo um padrão para sua determinação. A divergência nos resultados ocorre devido ao uso de dois diferentes métodos, que se baseiam em princípios distintos para determinar o grau de hidrólise, de forma que cada método interage de maneira diferente com os peptídeos resultantes da hidrólise. O método de OPA se baseia na medição de grupos amino gerados na hidrólise. Enquanto o método do TCA-N solúvel não avalia o grau de hidrólise diretamente, mas o nitrogênio solúvel, que consiste apenas de aminoácidos e pequenos peptídeos presentes na amostra, determinando-se o conteúdo de nitrogênio pelo método de Bradford (RUTHERFURD et al, 2010).

5.3. Concentração de Aminoácidos Livres

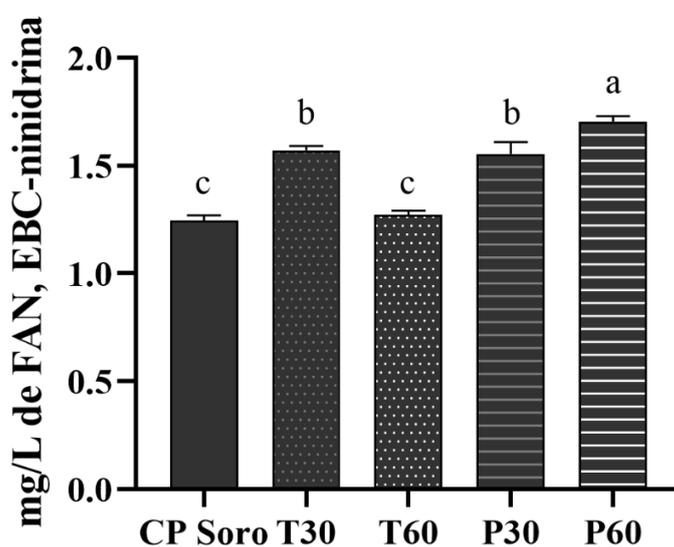
Os resultados observados na Figura 6 mostram que os hidrolisados apresentaram uma concentração de aminoácidos livres significativamente maiores quando comparados com o concentrado proteico do soro de leite (CP Soro). A maior concentração de aminoácidos livres observada foi após 60 min de hidrólise com a enzima pepsina (P60), com 1,70 mg/L de α -aminonitrogênio livre (FAN), estando de acordo com o observado pelo método TCA-N solúvel, na qual foi o maior grau de hidrólise registrado.

Contudo, observa-se que no tratamento com tripsina a 60 min (T60) ocorreu uma diminuição na concentração de aminoácidos livres. A pepsina e a tripsina são enzimas proteolíticas cuja função é hidrolisar polipeptídios na digestão. A tripsina possui uma ação mais específica, clivando ligações peptídicas envolvendo carboxilas dos resíduos de aminoácidos básicos lisina e arginina. Enquanto o mecanismo da pepsina envolve a clivagem

das ligações peptídicas dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, que estão presentes em maior concentração no leite (BITTAR, 2003; MELLO, 2009).

É provável que essas diferenças no mecanismo de ação das enzimas tenham gerado divergências na quantidade de aminoácidos livres, com a tripsina clivando mais especificamente as proteínas do soro, aumentando o grau de hidrólise, mas sem gerar muitos aminoácidos livres, enquanto a pepsina libera uma maior quantidade de aminoácidos livres, apesar de ter apresentado um menor grau de hidrólise pelo método de OPA.

Figura 6 – Concentração de aminoácidos livres do soro de leite caprino e dos hidrolisados com tripsina e pepsina, nos tempos de 30 min e 60 min.



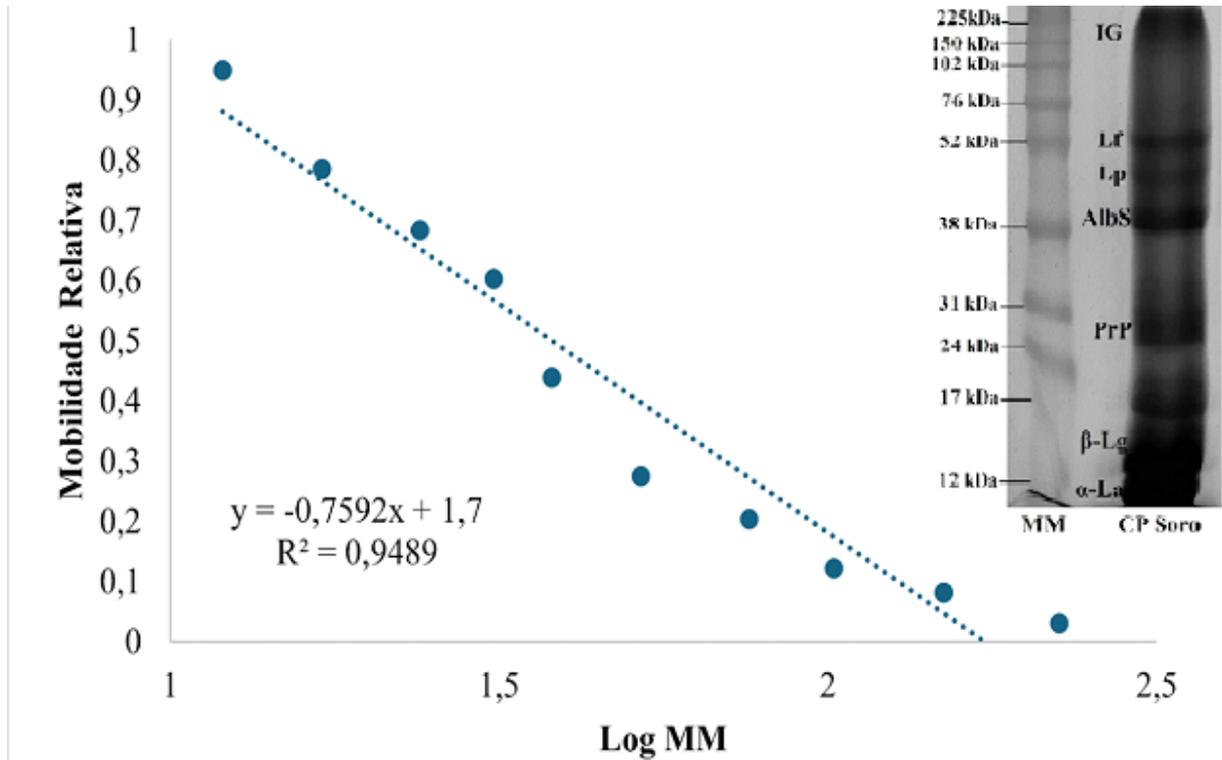
*Dados com diferentes letras minúsculas indicam diferenças significantes entre os tratamentos pela análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do teste de Tukey com significância de 5%.

5.4. Identificação das Proteínas do Soro e dos Peptídeos Obtidos por Hidrólise

O perfil proteico do soro de leite e dos hidrolisados obtidos foi identificado por SDS-PAGE, no qual foram identificadas sete bandas proteicas principais. O peso molecular relativo das proteínas foi analisado por meio de uma regressão linear simples a partir do marcador de peso molecular Amersham ECL Rainbow. Na Figura 7, foi possível identificar e estimar o peso molecular das proteínas imunoglobulinas (149 kDa), lactoferrina (77 kDa), lactoperoxidase (59 kDa), albumina sérica (46 kDa), proteoses/peptonas (23 kDa), β -lactoglobulina (13 kDa) e α -lactoalbumina (9 kDa), respectivamente, coincido com

comparativos aos trabalhos sobre soro do leite caprino de Campos et al (2022) e Alves et al (2014).

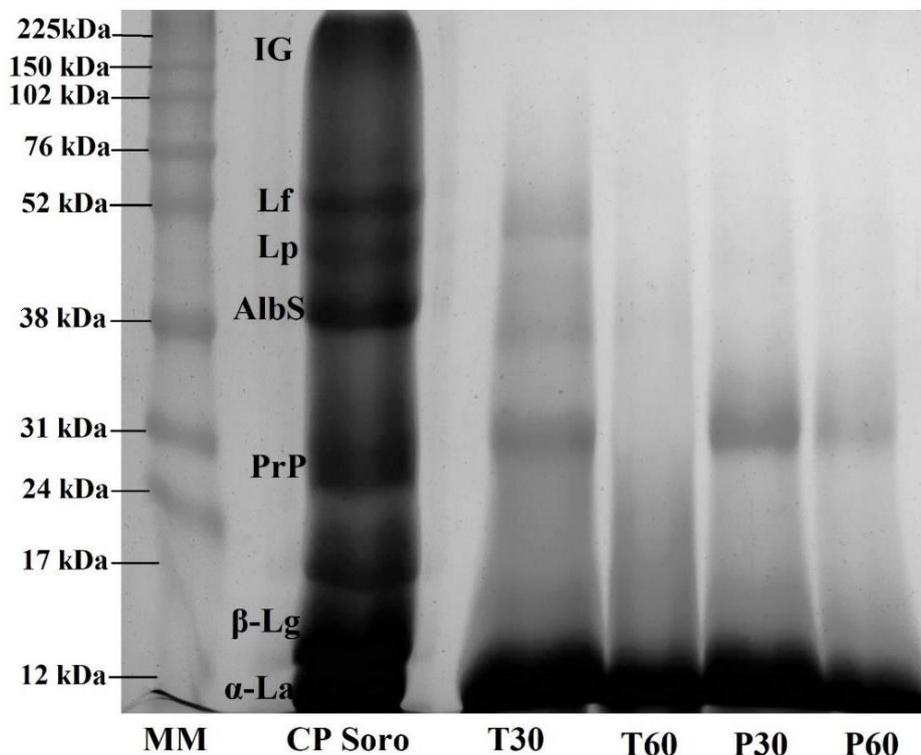
Figura 7 – Perfil proteico do soro de leite caprino e verificação do peso molecular a partir da mobilidade relativa da SDS-PAGE.



Os peptídeos obtidos por hidrólise enzimática foram analisados por SDS-PAGE e apresentaram um perfil diferente do concentrado proteico do soro, como observado na Figura 8. É possível notar o deslocamento e desaparecimento das bandas proteicas no gel, sugerindo que a hidrólise foi efetiva. Isso ocorre devido à quebra da ligação peptídica das proteínas pelas enzimas durante a hidrólise, resultando na produção moléculas de menor peso molecular, como peptídeos e aminoácidos, e modificações na sua estrutura original (ROMAN & SCARBIERI, 2005).

Ainda, observa-se que o tratamento com a tripsina foi capaz de hidrolisar quase todas as proteínas no tempo de 60 min, coincidindo com o resultado visto na Tabela 2 pelo método de OPA, que observou o melhor grau de hidrólise para esse tratamento. Esses resultados sugerem que esse tratamento resultou na clivagem mais efetiva das ligações peptídicas das proteínas da amostra e que é possível verificar que o método de OPA seria mais confiável e adequado para avaliar a hidrólise.

Figura 8 – Identificação do perfil proteico do soro de leite caprino da raça Torggenburg por meio da SDS-PAGE. (IG – Imunoglobulinas; Lf – Lactoferrina; Lp – lactoperoxidase; AlbS – albumina sérica; PrP – Protease/peptonas; β -Lg - β -lactoglobulina; α -La - α -lactoalbumina).



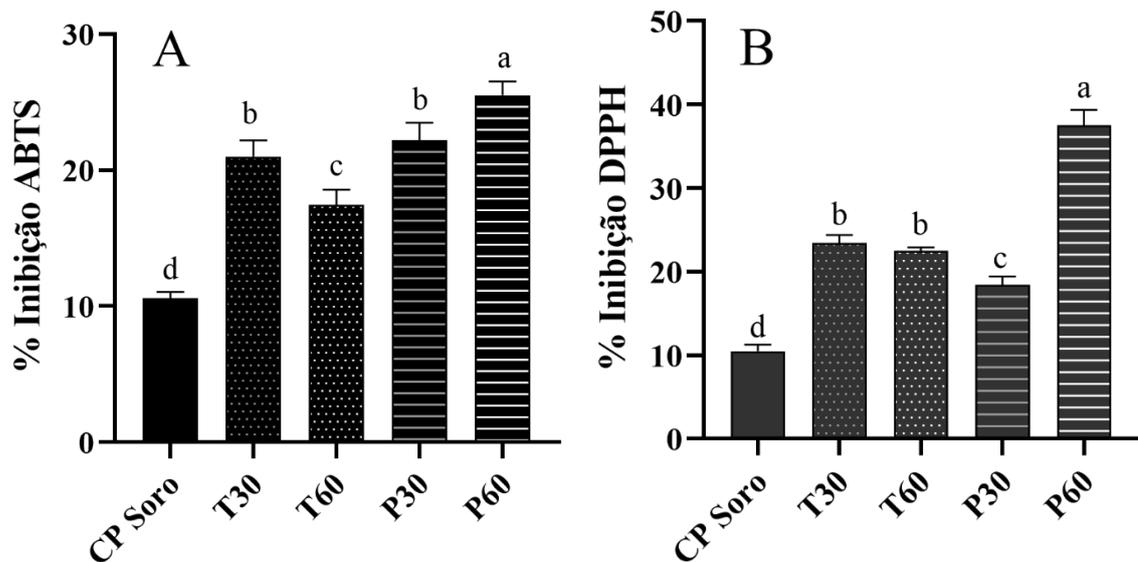
5.5. Atividade Antioxidante pelos Métodos ABTS E DPPH

A Figura 9 mostra o efeito do tipo de enzima e do tempo de hidrólise na atividade de captura do radical ABTS e do radical DPPH. Os resultados indicam que a hidrólise enzimática do concentrado proteico de soro de leite pela tripsina ou pepsina resultou em um aumento na inibição de ambos os radicais. Essa atividade ocorre porque a hidrólise enzimática causa alterações na estrutura original das proteínas, levando a uma diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos, aumentando a acessibilidade dos peptídeos aos seus alvos (MARCONE et al, 2017; ROMAN & SCARBIERI, 2005).

A hidrólise com pepsina por 60 min (P60) resultou no melhor desempenho da capacidade de captura de ambos os radicais, com inibição de 25,51% no ABTS em comparação com 10,60% do CP Soro, e uma inibição de 37,19% no DPPH comparado com 10,39% do CP Soro. A amostra P60 também havia apresentado melhor grau de hidrólise pelo método do TCA-NS e maior concentração de aminoácidos livres, como já citado nos itens 5.2

e 5.3. Pode-se indicar que, junto aos peptídeos formados na hidrólise enzimática, houve a liberação de aminoácidos que podem ter levado a um aumento na atividade antioxidante.

Figura 9 – Atividade de captura do radical ABTS (A) e do radical DPPH (B) do soro de leite caprino e hidrolisados com tripsina e pepsina, por 30 min e 60 min.



*Dados com diferentes letras minúsculas indicam diferenças significantes entre os tratamentos pela análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do teste de Tukey com significância de 5%.

Nos hidrolisados gerados pela ação da tripsina, é possível observar que o tempo de reação da hidrólise não afetou a atividade de captura do radical DPPH, enquanto na atividade de captura do radical ABTS houve uma diminuição com o aumento do tempo. A hidrólise não necessariamente vai aumentar a atividade antioxidante, pois depende da clivagem entre aminoácidos específicos e os peptídeos gerados (KRUNIC & RAKIN, 2022).

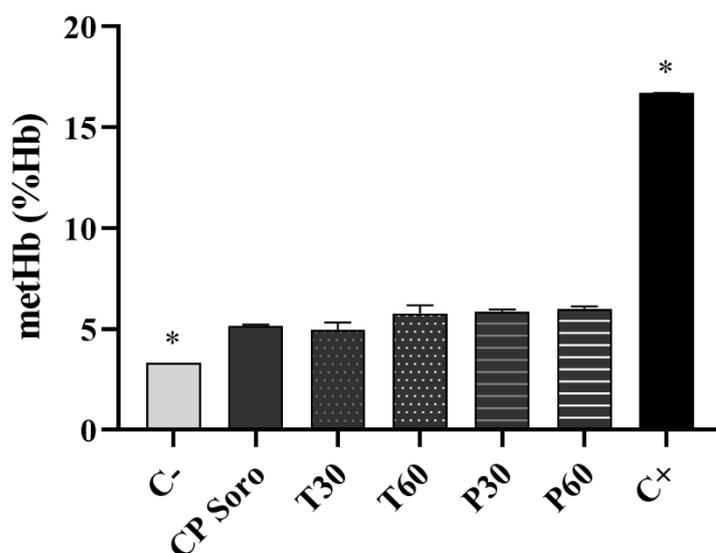
Sarabandi et al (2018) também observaram uma diminuição na atividade antioxidante com o aumento do tempo da hidrólise da caseína bovina, e explicam que essa diminuição pode ser devido a um aumento na liberação de aminoácidos hidrofóbicos e a menor disponibilidade de antioxidantes hidrofílicos para reagir com os radicais ABTS e DPPH. Isso sugere que a atividade antioxidante depende do tipo de enzima, grau de hidrólise e composição de aminoácidos dos peptídeos gerados.

Ainda, ao analisar o poder de redução total, as amostras do concentrado proteico do soro e seus hidrolisados não apresentaram poder redutor.

5.6. Ação Oxidante e Antioxidante sobre a Hemoglobina de Eritrócitos Humanos

A ação oxidante das amostras do concentrado proteico do soro e peptídeos obtidos na hidrólise podem ser verificadas na Figura 10. Camargo et al (2007) explicam que os valores normais da metahemoglobina variam entre 1,9 e 3,8%, considerando-se acima de 4% um valor elevado. Todas as amostras ficaram acima desse parâmetro, variando entre 4,9 e 6,0%, sendo significativamente maiores do que o controle negativo da hemoglobina (C-), que correspondeu a 3,3%. Apesar das amostras promoverem uma atuação oxidativa na hemoglobina, é inferior quando comparada com o agente oxidativo fenilhidrazina (C+), que apresentou valor de 16,7%.

Figura 10 – Ação oxidante das amostras de concentrado proteico do soro (CP Soro) e seus hidrolisados pela formação de metahemoglobina. Controle negativo da hemoglobina (C-) e fenilhidrazina (C+).



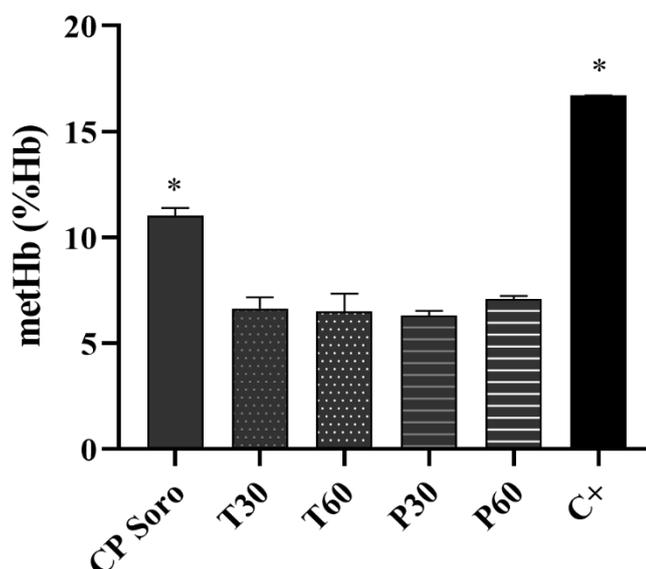
Dados com diferenças significativas utilizando-se a análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($p < 0,0001$).

Ao analisar a ação antioxidante, observa-se, na Figura 11, que as amostras impediram significativamente a oxidação da hemoglobina pela ação do agente oxidante fenilhidrazina. Após exposição ao agente oxidante, a oxidação da hemoglobina foi maior na amostra tratada com o concentrado proteico do soro de leite, obtendo-se um valor de 11,0%. Os hidrolisados apresentaram os menores percentuais de oxidação da hemoglobina, variando entre 6,6 e 7,1%,

em comparação com 16,7% do controle da fenilhidrazina. Quando comparados entre si, os hidrolisados não apresentaram diferenças significativas.

Além disso, ao analisar o poder de redução total, as amostras do concentrado proteico do soro e seus hidrolisados não apresentaram poder redutor. Essa análise verifica a capacidade da amostra em reduzir íons metálicos oxidados, como ocorre na formação da metahemoglobina, em que há a oxidação do íon ferroso em íon férrico. Isso pode justificar porque as amostras apresentaram uma atuação oxidante na hemoglobina e porque elas não se diferiram entre si.

Figura 11 – Ação antioxidante do concentrado proteico do soro (CP Soro) e dos seus hidrolisados sobre a oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina (C+).



Dados com diferenças significativas utilizando-se a análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($p < 0,0005$).

Observa-se que os hidrolisados obtiveram uma melhor atividade antioxidante do que o concentrado proteico do soro, impedindo mais efetivamente a oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina. Isso ocorre devido as alterações estruturais que a hidrólise enzimática causa nas proteínas, como citado anteriormente, especialmente exposição de aminoácidos hidrofóbicos e grupos ionizáveis, essenciais para a capacidade antioxidante dos peptídeos (MARCONE et al, 2017; ROMAN & SCARBIERI, 2005). Este mecanismo antioxidante é de grande importância no organismo, pois evita a oxidação da hemoglobina em

metahemoglobina, mantendo, dessa forma, o transporte de oxigênio pela hemoglobina e o funcionamento adequado dos eritrócitos (ARBOS et al, 2008).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As proteínas presentes no soro de leite caprino da raça Torggenburg apresentaram um alto teor proteico e capacidade de gerar peptídeos bioativos por hidrólise enzimática. Os hidrolisados obtidos a partir dessas proteínas apresentaram atividade antioxidante significativa, especialmente os que foram obtidos pela hidrólise com a pepsina por 60 min, de forma que se verifica que o tempo e a enzima influenciaram positivamente o grau de hidrólise e a atividade antioxidante.

Portanto, além de fortalecer a produção de caprinos no estado da Paraíba, pode-se considerar a aplicação desses hidrolisados como ingrediente a ser usado na indústria alimentícia a fim de atuar de maneira antioxidante na conservação dos produtos, ou ainda na formulação de produtos nutracêuticos e até possíveis aplicações na indústria farmacêutica. Ainda, faz-se necessário mais estudo para avaliar a multifuncionalidade desses peptídeos, como análise anti-inflamatória ou antibacteriana, e estimular mais aplicabilidades a esses hidrolisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHILLE, I. et al. Summary of Joint European Hematology Association (EHA) and EuroBloodNet Recommendations on Diagnosis and Treatment of Methemoglobinemia. **HemaSphere**, v. 5, n. 12, 2021.
- AGYEI, D. et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 244-256, 2016.
- AHMED, S. A.; EL-BASSIONY, T; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 44, p. 80-88, 2015.
- ALVES, M. P. et al. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ARBOS, K. A. et al. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.
- ATHIRA, S. et al. Production and characterisation of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. **J Sci Food Agric**, v. 95, p. 2908 – 2915, 2014.
- BARBOSA, R. F. **Avaliação da sustentabilidade da caprinocultura leiteira no cariri ocidental paraibano: uma adaptação metodológica**. Tese (Doutorado em Engenharia e Gestão de Recursos Naturais). Universidade Federal de Campina Grande – Campina Grande, PB, 2021.
- BITTAR, E. R. **Estudo termodinâmico da estabilidade do tripsinogênio e da β -tripsina e suas interações interdomínios**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, 1976.
- CAMARGO, T. M.; ALVES, M. I. F.; OLIVEIRA, S. J.; SHITARA, E. S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.2, p.95-98, 2007.

CAMPOS, M. I. F. et al. Artigo de revisão: Propriedades biológicas das proteínas e peptídeos do soro de leite caprino. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, 2022.

CAMPOS, M. I. F. **Identificação do perfil proteico e bioprospecção do soro de leite de cabra concentrado e hidrolisado**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

CHAKRABARTI S. et al, Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. **BioMed Research International**, 2014.

CHAKRABARTI, S., GUHA, S., MAJUMDER, K. Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2018.

CLARO, L. M. et al. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. **Cell Biochem Funct**, v. 24, p. 531-535, 2006.

EGITO, A. S. et al. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, 2006.

EMBIKIEKAH S. et al. Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey hydrolysates. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, 2017.

FEITOSA, J. F. F. et al. Caprinocultura leiteira no semiárido: Um estudo acerca do sistema produtivo em uma associação no Cariri Paraibano. **Revista Agropampa**, v. 1, n. 1, 2020.

FRANCO, R. et al. Antioxidant defense mechanisms in erythrocytes and in the central nervous system. **Antioxidants**, v. 8, n. 46, 2019.

GARCIA, R. V. & TRAVASSOS, A. E. R. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 81-88, 2012.

JAKUBCZYK K. et al. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Pol Merkur Lekarski**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

KHALDI, N.; HOLTON, T. A.; SHIELDS, D. C. Amino acid enrichment and compositional changes among mammalian milk proteins and the resulting nutritional consequences. **Journal of Dairy Science**. n. 97, 2014.

KHAN, I. T. et al. Antioxidant Properties of milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in Health and Disease**, 2019.

KIM, S. W. & WU, G. Regulatory role for amino acids in mammary gland growth and milk synthesis. **Amino Acids**, v. 37, p. 85-95, 2009.

KRUNIC, T.Z.; RAKIN, M. B. Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: Impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages. **Food Chemistry**, v. 370, 2022.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, n. 5259, 1970.

LI, X.Y. et al. Change in the structural and functional properties of goat milk protein due to pH and heat. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1337-1351, 2020.

LIE, S. The EBC-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 1, 1973.

LOCH, J. I. et al. Conformational variability of goat β -lactoglobulin: Crystallographic and thermodynamic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1283-1291, 2015.

MAGALHÃES, I. S. et al. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. **Food Research International**, v. 157, 2022.

MANSOR, M. et al. Cross-reactivity analysis of milk proteins from different goat breeds with cow's milk allergens using a proteomic approach. **Molecular Immunology**, v. 155, p. 44-57, 2023.

MARCONE, S. et al. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. **Br J Clin Pharmacol**, v. 83, p. 152-162, 2017.

MELLO, K. G. P. C. **Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e o-carboximetilquitosana**. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MOHSIN, A. Z. et al. Chemical and mineral composition of raw goat milk as affected by breed varieties available in Malaysia. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 815-824, 2019.

- MORR, C. V. et al. A collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, 1985.
- NAYIK, G. A. et al. Nutricional Profile, Processing and Potential Products: A Comparative Review of Goat Milk. **Dairy**, v. 3, p. 622-647, 2022.
- NCUBE, K. T. et al. Genomic Tools for Medicinal Properties of Goats Milk for Cosmetic and Health Benefits. A Review. **Preprints**, 2024.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OLIVEIRA, R. V. et al. Manual de criação de caprinos e ovinos. Brasília: **Codevasf**, 2011. 142 p. ISBN 978-85-89503-11-2
- OYAIZU, M. Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **Japan Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.
- PELEGRINE, D. H. & GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n.1, p. 57-65, 2003.
- PITHAN E SILVA, R. O., BUENO, C. R. F., SÁ, P. B. Z. R. Aspectos relativos à produção de soro de leite no Brasil, 2007-2016. **Informações Econômicas**, v. 47, n. 2, 2017.
- ROMAN, J. A. & SCARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 3, p. 468-474, 2005.
- RUFINO, M. S. M. et al. **EMBRAPA - Comunicado técnico 127. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza, 2007a.
- RUFINO, M. S. M. et al. **EMBRAPA – Comunicado técnico 128. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+**. Fortaleza, 2007b.
- RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, 2010.

SANSI, M. S. et al. In vitro biosafety and bioactivity assessment of the goat milkprotein derived hydrolysates peptides. **Journal of Food Safety**, v. 43, n. 2, 2023.

SARABANDI, K. et al. Microencapsulation of casein hydrolysates: physicochemical, antioxidant and microstructure properties. **Journal of Food Engineering**, v. 237, 2018.

SENAR. **Caprinocultura: criação e manejo de caprinos de leite**. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 96p. Brasília: Senar, 2020.

SIES H. & JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agentes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 363-383, 2020.

SILVA, R. B. D. **Antioxidantes alimentares e os efeitos da oxidação lipídica no alimento**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnológico em Processos Químicos) – Faculdade de Tecnologia de Campinas, Campinas, 2021.

SOUZA, E. L. et al. Qualidade do queijo de leite de cabra tipo Coalho condimentado com cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith). **Braz. J. Food Technol.**, v. 14, n. 3, 2011.

SPELLMAN, D. et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 447-453, 2003.

VOLOSHYNA, I. M. et al. Practical use of goat milk and colostrum. **Biotechnologia Acta**, v. 15, n. 5, p. 38-48, 2021.