

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição

Área de Ciência dos Alimentos

Juliana Cristina Bassan

**CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE DE BÚFALA:
IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS E PRODUÇÃO DE
HIDROLISADOS COM MÉDIO E ALTO GRAU DE
HIDRÓLISE**

ARARAQUARA

2012

Juliana Cristina Bassan

**CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE DE BÚFALA:
IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS E PRODUÇÃO DE
HIDROLISADOS COM MÉDIO E ALTO GRAU DE
HIDRÓLISE**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição, área de
Ciência dos Alimentos.**

Prof.Dr. Antonio José Goulart

ARARAQUARA

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B317c Bassan, Juliana Cristina
Caracterização do soro de leite de búfala: identificação das proteínas e produção de hidrolisados com médio e alto grau de hidrólise / Juliana Cristina Bassan. – Araraquara, 2012
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Antonio José Goulart

1. Soro proteínas. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Biodisponibilidade. 4. Aminoácidos. I. Goulart, Antonio José, orient. .II. Título.

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

PROF. DR. ANTONIO JOSÉ GOULART
ORIENTADOR

PROFA. DRA. RENATA BONINI PARDO

PROF. DR. HAMILTON CABRAL

DEDICATÓRIA

A DEUS.

Por sempre estar à frente de minha vida ajudando-me nos momentos de incerteza e saudade. Agradeço pela minha vida e por ser meu refúgio e atender às minhas preces, pela minha família, por meus amigos e pelo amor a nós dedicado.

Muito obrigada.

À minha família, razão da minha vida.

Pelo apoio e amor incondicional. Por ter me ensinado e encorajado a lutar pelos meus sonhos. À minha mãe Marlene, que apesar de todas as dificuldades e perdas, soube educar seus filhos com muito amor e sabedoria. Ao meu irmão André pelo grande companheiro que é e por sempre me socorrer nos momentos de dificuldade; e à minha irmã Natália por ser a “caçulinha” mais mimada e amorosa. Também agradeço ao meu amado pai José, que apesar de ter nos deixado tão cedo, sempre foi meu exemplo e me ensinou desde cedo que o trabalho dignifica um homem.

Obrigado Pai, Mãe e irmãos; sem vocês nada seria.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Antonio José Goulart por toda paciência, respeito, confiança e ensinamento. Pelos momentos de muitas alegrias e por ter caminhado lado a lado durante o meu trabalho e por muitos dias que ainda estão por vir.

Ao amigo, professor e grande homem, Prof. Dr. Rubens Monti, por ter me possibilitado realizar o tão desejado curso de Mestrado e por aceitar me orientar no curso de Doutorado. Pelo carinho e respeito com que trata seus alunos, fazendo de nossos dias no laboratório, momentos de muita satisfação. Por sempre estar disposto a nos ajudar e aconselhar, além de nos incentivar e acreditar em nosso potencial. Prof. Rubens Monti, obrigada por compartilhar seu conhecimento e parceria.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Thaís, Ozeni, Antonio, Ana, Andréa, Caio, Júlio, Vinícius, Natália Salomão e Dani, pelos momentos de muita descontração e por estarem sempre disponíveis e me ajudando a concretizar o curso de Mestrado.

Aos meus amigos, Mariana, Raquel, Gabriela, Lara, Nadiége, Guilherme, Ana Lúcia, Ederlan e muitos outros mais, que tive o privilégio de conhecer através da Pós-Graduação, o meu muito obrigado, pois a companhia de vocês fez os meus dias mais felizes.

À minha amiga, “mãe” e “irmã” Gisela e toda sua família, pelo carinho, respeito e confiança e pela acolhida em sua casa. A vocês sou eternamente grata.

À Profa. Alice Yoshiko Tanaka, minha amiga querida, a qual sou eternamente grata por ter-me ajudado a chegar até a UNESP/ARARAQUARA. Mulher admirável e que tenho como uma segunda mãe, pois sempre esteve comigo me aconselhando em todos os momentos em que precisei. Obrigada pelos ensinamentos valiosos que compartilhou e ainda compartilha.

Aos meus professores de graduação e grandes amigos, Profa. Dra Renata Bonini Pardo, Prof. Dr. Luiz Fernando Santos Escouto, Prof. Dr. Paulo Sérgio Marinelli e Profa. Dra Marie Oshiiwa por todo o incentivo, amizade e por terem sido os primeiros a acreditar em minha capacidade e também por estarem sempre presentes em meu cotidiano.

Às minhas queridas amigas Delfina Alfredo Manjate e Dalcira Sgarbi Boralli que mesmo longe e praticamente virtuais, estão sempre comigo, proporcionando momentos de muita descontração, dividindo experiências e acreditando em meu potencial. Amigas, vocês são exemplos de vida, cada uma com sua particularidade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e principalmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade oferecida.

Ao Prof.Dr. Saulo Santesso Garrido, do Instituto de Química de Araraquara, pela ajuda e amizade que vem prestando e demonstrando a longo tempo à equipe do laboratório de Enzimologia no qual desenvolvi meu projeto de Mestrado e desenvolverei meu Doutorado.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro, tão necessário.

Aos que aqui não foram citados, mas que direta ou indiretamente fizeram e fazem parte dessa caminhada.

O meu muito obrigado a todos!

RESUMO

O leite de búfala representa 12% da produção mundial de leite, com maiores teores de proteínas e gorduras que o de vaca. O soro de leite é o co-produto da indústria queijeira que vem sendo, muitas vezes, descartado no meio ambiente, causando grande impacto ambiental em função de sua constituição rica em proteínas e lactose. Hidrólise enzimática é um avanço tecnológico importante por melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dessas proteínas. O objetivo do trabalho foi produzir hidrolisados protéicos a partir das proteínas presentes no soro do leite de búfala e simular a digestão *in vitro* pelo método da dialisabilidade. O soro lácteo bubalino foi dialisado para retirada de lactose e pequenos peptídeos e aminoácidos, e tratado com caulim para adsorção da gordura. Os produtos de médio e alto grau de hidrólise foram obtidos por ação da pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A em pHs e temperaturas específicos, adicionados ao soro conjuntamente e em separado, em diferentes tempos de hidrólise. A determinação quantitativa de proteínas, aminoácidos, lactose e gordura foram realizadas segundo os métodos Bradford (1976), cromatografia líquida de alta eficiência, Miller (1959) e Gerber, respectivamente. A caracterização qualitativa das proteínas e produtos de hidrólise fez-se por eletroforese não-desnaturante (PAGE) e desnaturante (SDS-PAGE). Os ensaios de biodisponibilidade dos produtos de hidrólise foram realizados pelo método *in vitro* da dialisabilidade segundo metodologia descrita por Luten et al. 1996. Os resultados encontrados para o soro deslactosado e desengordurado foram 6,53g prot.L⁻¹, redução de 99% de lactose e < 0,10 % de gordura. Bandas protéicas com migrações relativas (R_m) semelhantes às do soro bovino foram observadas por SDS-PAGE. Entretanto, no soro bubalino detectou-se uma banda protéica com R_m de 0,73 que não é encontrada no bovino. A α -lactoalbumina e β -lactoglobulina foram as mais resistentes à hidrólise prolongada; no entanto, com tempos maiores de hidrólise houve aumento de peptídeos de baixa massa molar e aminoácidos. O soro lácteo bubalino mostrou ser uma fonte de aminoácidos essenciais como a leucina, lisina, fenilalanina, histidina, treonina e arginina. A concentração relativa de aminoácidos dialisáveis para o soro lácteo bubalino não hidrolisado, de médio e alto grau de hidrólise foram 4448,516 nM, 4548,052 nM e 4735,373 nM, respectivamente. O soro do leite de búfala contém quantidade significativa de proteínas disponíveis que poderão ser utilizadas como suplementação alimentar e fins tecnológicos com significativa concentração de aminoácidos essenciais.

PALAVRAS-CHAVE: biodisponibilidade, dialisabilidade, proteínas do soro do leite, leite de búfala.

ABSTRACT

Buffalo milk represents 12% of world production of milk, with high protein and fat content of the cow. The whey is the co-product of cheese industry that has been often discarded into the environment, causing great environmental impact due to its rich protein and lactose constitution. Enzymatic hydrolysis is an important technological advance to improve the physical, chemical and functional properties of these proteins. The objective of this research was to produce protein hydrolysates from whey proteins present in buffalo milk and to simulate the digestion *in vitro* by the method of dialyzability. The whey was dialyzed to remove lactose and small peptides and amino acids, and treated with kaolin for fat adsorption. The partial and total hydrolysates were obtained by the action of pepsin, trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase A in specific pH and temperature, added to the whey together or separately at different times of hydrolysis. Quantitation of proteins, amino acids, lactose and fat were performed according to Bradford (1976), HPLC, Miller (1959) and Gerber respectively. The qualitative characterization of proteins and hydrolysis products was made by PAGE and SDS-PAGE. Tests of absorption of hydrolysis products were performed *in vitro* by dialyzability. The results for dialyzed and defatted whey was 6.53 g prot L⁻¹, reduction of 99% lactose and <0.10% fat. Protein bands with relative migration (R_m) similar to bovine whey were observed in SDS-PAGE. However, buffalo whey showed a protein band with R_m 0.73 that is not found in the bovine. The α-lactalbumin and β-lactoglobulin were the most resistant to hydrolysis prolonged; however, with longer times of hydrolysis occurred increase in peptides of low molecular weight and amino acids. The whey also proved to be a source of essential amino acids, such as leucine, lysine, phenylalanine, histidine, threonine and arginine. The relative concentration of amino acids for the dialyzable not hydrolyzed whey buffalo, medium and high degree of hydrolysis were , 4448.516 nM, 4548.052 nM e 4735.373 nM respectively. The whey of buffalo milk contains significant amount of protein available that can be used as a supplemental food or with technological purposes with a high concentration of essential amino acids.

KEY WORDS: bioavailability, dialyzability, milk whey protein, buffalo milk.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Ranking dos oito maiores produtores mundiais de leite bovino e bubalino no ano de 2009. 23

Capítulo 2

- Figura 1.** Fluxograma do médio e alto grau de hidrólise das proteínas presentes no soro do leite de búfala. 51

- Figura 2.** Perfil proteico do soro de leite bovino tratado (1) e bubalino tratado (2) por PAGE – 10% corado com prata segundo o método de Blum et al. (1987). 55

- Figura 3.** SDS-PAGE – 12% comparando as proteínas do soro do leite bovino e bubalino corado com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). 56

- Figura 4.** SDS-PAGE – 12% dos produtos de hidrólise com MGH do soro do leite bubalino corado com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). 58

- Figura 5.** SDS-PAGE – 12% dos produtos de hidrólise com AGH do soro do leite bubalino corado com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). 59

- Figura 6.** Cromatograma do soro do leite bubalino não hidrolisado (NH). 60

- Figura 7.** Cromatograma do soro do leite bubalino com médio grau de hidrólise (MGH). 61

- Figura 8.** Cromatograma do soro do leite bubalino com alto grau de hidrólise (AGH). 62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Principais componentes do leite determinados no decorrer da história.	20
Tabela 2. Composição básica e potencial hidrogeniônico do leite de búfala e de vaca pasteurizados.	25
Tabela 3. Composição em ácidos graxos do leite bovino e bubalino.	26
Tabela 4. Concentração e algumas propriedades das principais proteínas do leite bubalino.	27
Tabela 5. Propriedades funcionais de algumas frações protéicas do soro do leite.	31

Capítulo 2

Tabela 1: Concentração de proteínas, lactose e gordura do soro do leite bubalino <i>in natura</i> e tratado.	54
Tabela 2: Perfil aminoacídico do soro do leite bubalino NH, com MGH e AGH antes e após a dialisabilidade	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: aminoácidos

α -La: alfa-lactoalbumina

AGH: alto grau de hidrólise

AGH-DG= alto grau de hidrólise digerido gástrico

AGH-DIext= alto grau de hidrólise digerido intestinal externo

AGH-DIint= alto grau de hidrólise digerido intestinal interno

β -Lg: beta-lactoglobulina

CLA: *conjugated linoleic acid*

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DBO: demanda biológica de oxigênio

FAO: *Food and Agriculture Organization*

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

HPLC: *high-performance liquid chromatography*

Ig: imunoglobulina

MM: massa molecular

NG: não gordurosos

NH=não hidrolisado

NH-DG=não hidrolisado digerido gástrico

NH-DIext=não hidrolisado digerido intestinal externo

NH-DIint=não hidrolisado digerido intestinal interno

OPA: orto-ftalaldeído

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*

PB: proteína bruta

PC: ponto de congelamento

MGH: médio grau de hidrólise

MGH-DG= médio grau de hidrólise digerido gástrico

MGH-DIext= médio grau de hidrólise digerido intestinal externo

MGH-DIint= médio grau de hidrólise digerido intestinal interno

pI: ponto isoeletrico

Rf: mobilidade eletroforética relativa

Rm: migração relativa

SA: soro albumina

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFA: *saturated fatty acids*

UV: ultra violeta

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 LEITE: ASPECTOS GERAIS	19
2.2 LEITE DE BÚFALA	22
2.3 SORO DO LEITE BOVINO.....	28
2.3.1 Generalidades	28
2.3.2 Proteínas do soro: aspectos gerais	29
2.3.3 Proteínas do soro do leite de búfala.....	31
2.4 HIDROLISADOS PROTÉICOS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	31
2.5 PROTEASES DIGESTIVAS: PEPSINA, TRIPSINA, QUIMOTRIPSINA E CABOXIPEPTIDASE-A.	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

CAPÍTULO 246

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BUBALINO E DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS POR DIALISABILIDADE.....	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
Material.....	49
Métodos	50
Obtenção do soro doce do leite bubalino.....	50
Hidrólise Enzimática	50
Simulação in vitro da digestão gastrointestinal pelo método da dialisabilidade dos soros do leite bubalino não hidrolisado (NH), médio grau de hidrólise (MGH) e alto grau de hidrólise (AGH).....	51
Dosagem de proteína total, lactose e gordura.....	52
Análise do perfil protéico das proteínas do soro do leite bubalino por PAGE e SDS-PAGE.....	53

Análise dos hidrolisados de médio e alto grau de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
Dosagem de proteínas, lactose e gordura em soro doce do leite bubalino em diferentes condições	53
Caracterização do perfil protéico do soro do leite bubalino comparado com o soro do leite bovino por PAGE e SDS-PAGE	54
Caracterização do soro lácteo bubalino com MGH e AGH por SDS-PAGE e CLAE.....	56
Obtenção de aminoácidos do soro do leite bubalino não hidrolisado e com médio e alto grau de hidrólise antes e após o método da dialisabilidade.	63
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A procura por nutrientes em fontes alimentares alternativas vem sendo bastante explorada no meio científico. Uma das justificativas para essa busca é suprir as necessidades nutricionais da população que está passando por um momento de grande expansão demográfica e, em contra corrente, cada vez mais os espaços destinados à produção de matérias-primas alimentares básicas estão sendo exploradas de forma indiscriminada e perdendo sua capacidade de produção.

Nesta linha, o aproveitamento de resíduos produzidos pela indústria de alimentos vem despontado como potenciais fontes de nutrientes alimentares de elevado valor biológico e funcional, além do baixo custo de produção e diminuição do impacto negativo no ambiente. Um exemplo bastante conhecido é o soro do leite obtido a partir da produção de queijos. Hoje já se sabe que este líquido amarelo-esverdeado é rico em nutrientes e, dentre eles, há destaque para a alta concentração de lactose e a presença de proteínas solúveis com propriedades biológicas e funcionais bastante significativas.

Em países como os Estados Unidos, o aproveitamento do soro do leite é quase que total. Através de pesquisas e técnicas avançadas, já são possíveis a separação e purificação dos componentes do soro lácteo, sendo disponibilizados no mercado vários produtos como os concentrados, isolados e hidrolisados proteicos, lactose, entre outros.

Em se tratando das soro proteínas, extensas pesquisas vêm sendo realizadas, pois já se sabe que em sua estrutura polipeptídica existem segmentos de aminoácidos com propriedades bioativas benéficas à saúde humana. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* já foram realizados e efeitos biológicos já foram confirmados, como por exemplo: efeito anti-hipertensivo, anticarcinogênico, efeito opióide, antimicrobiando, entre outros. Além disso, apresentam propriedades funcionais como formação de espuma, capacidade emulsificante e geleificante.

Apesar de todo esse avanço técnico-científico, as pesquisas com proteínas lácteas estão praticamente restritas ao soro obtido do leite bovino devido à alta produção e consumo mundial de leite e queijos dessa origem. No entanto, com a espécie bubalina, conhecida internacionalmente por produzir o leite que origina a famosa *mozzarella* de búfala, poucos estudos foram realizados com suas soro proteínas. A espécie bubalina está atrás somente do rebanho bovino no que se relaciona à produção de leite em âmbito mundial. Nos continentes

asiático, africano e na América Latina há uma considerável produção de leite bubalino e em países como Índia e Paquistão a principal espécie produtora de leite é a bubalina, que já movimenta uma parte da economia, inclusive a brasileira com a produção de muçarela.

Os trabalhos encontrados na literatura sobre as proteínas do soro do leite bubalino normalmente estão relacionados com a caracterização e pouco relacionados com sua quantificação. Neste trabalho, a proposta foi a produção de hidrolisados com médio e alto grau de hidrólise a partir das proteínas do soro lácteo bubalino. Para tanto, o soro foi tratado e caracterizado para se acompanhar o ponto final do grau de hidrólise. O método de hidrólise adotado foi o enzimático, justamente por se tratar de um processo onde se minimiza perdas na qualidade nutricional do produto final e não se aplicam condições extremas de pH e temperatura. As enzimas escolhidas foram proteases presentes no sistema gastrointestinal de muito animais, inclusive o homem, com o intuito de diminuir efeitos adversos no caso do uso dos produtos de hidrólise como possíveis nutrientes utilizados para a suplementação dietética em humanos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE: ASPECTOS GERAIS

Existem hoje mais de 4000 espécies de mamíferos que vivem nos mais variados ecossistemas (McCLEALLAN, et al., 2008). A domesticação de animais como a vaca, cabra, ovelha e búfala e a capacidade de produzirem leite além do necessário para alimentar suas crias, possibilitou que essa matéria-prima passasse a fazer parte da dieta humana de forma que a espécie produtora de leite dominante em uma região é reflexo das suas condições geográficas e climáticas (VARNAM, SUTHERLAND, 1995). Mundialmente, a vaca é a principal espécie produtora de leite (AHMAD, et al., 2008) que, associado a produtos lácteos, tem uma longa tradição na nutrição humana (HAUG, et al., 2007).

Leite, do ponto de vista físico-químico, é um complexo fluido biológico secretado pelas glândulas mamárias, cuja composição e propriedades físicas variam de uma espécie para outra em função das necessidades dietéticas de cada mamífero recém-nascido, do período de lactação, da fonte de nutrientes ingerida e da idade e saúde do animal (VARNAM, SUTHERLAND, 1995; HAUG, et al., 2007). É um sistema polifásico que depende diretamente do grau de dispersão das moléculas. É uma emulsão de gordura e uma suspensão de micelas de caseína (caseína, cálcio e fósforo) todas suspendidas em uma fase aquosa que contém moléculas de lactose solubilizadas, soro proteínas e alguns minerais (GONZÁLEZ, 2001).

As classes de constituintes são similares entre espécies e raças, mas algumas diferenças tanto qualitativas (natureza) como quantitativas (componentes por litro) são verificadas e deixam claro que a composição do leite é diretamente dependente da espécie produtora (HUPPERTZ, KELLY, 2009)

A composição geral do leite pode ser dividida em dois grupos segundo a quantidade de seus componentes, ou seja, em componentes majoritários como água, gordura, proteínas, lactose e minerais (Tabela 1), e componentes minoritários como enzimas, vitaminas, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células diversas (epiteliais, leucócitos, bactérias, leveduras) e outros elementos (dióxido de carbono, oxigênio, nitrogênio) (RIEL, 1991).

Tabela 1. Principais componentes do leite determinados no decorrer da história.

Água (%)	Lactose (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Nitrogênio não proteico	Minerais (%)	Referência
86,87	4,00	3,50	4,75	-	0,70	Blyth, 1879
-	4,31	4,11	3,67	-	0,75	Richmond, 1898
86,90	5,10	3,90	3,20	-	0,90	Riel, 1991
-	4,80	3,70	3,40	0,19	0,70	Varmam e Sutherland, 1995
-	5,00	4,00	3,20	-	0,70	Séverin e Wenshui, 2005
-	5,30	3,30	3,20	-	-	Haug, HØstmark e Harstad, 2007
-	5,00	4,00	3,20	-	0,70	Mills, et al., 2011

Os componentes do leite são conhecidos principalmente por fornecerem elementos nutritivos que contribuem com a proteção imunológica de crianças e adultos (imunoglobulinas), por fornecerem substâncias biologicamente ativas (peptídeos bioativos, lactoferrina e lactoperoxidase), fatores de crescimento (hormônios), oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas com resíduos de ácido siálico que possuem papel anti-infeccioso, entre outros (SÉVERIN E WENSHUI, 2005).

Apesar de possuir propriedades nutricionais, imunológicas e fornecer substâncias biologicamente ativas (MILLS, et al., 2011), houve no ocidente um decréscimo no consumo de leite e derivados nas últimas décadas, fato que está associado a alguns efeitos negativos sobre a saúde. A crítica está principalmente sobre o conteúdo de gordura saturada que contribui diretamente para o surgimento de doenças cardíacas e obesidade (HAUG, et al., 2007). No entanto, estudos epidemiológicos demonstram que não há nenhuma evidência que o leite seja prejudicial à saúde (ELWOOD, et al., 2004).

De modo geral o leite apresenta sabor suave, agradável e ligeiramente doce-salgado, sendo a lactose e os minerais os grandes responsáveis por essas características. Muitos dos compostos que contribuem para o aroma e sabor do leite derivam da gordura, onde estão inclusos carbonilas, alcanos, lactonas, ésteres, compostos sulfurados e nitrogenados, e hidrocarbonetos tanto alifáticos como aromáticos (VARNAM, SUTHERLAND, 1995).

Sua cor (grau de brancura) é determinada pela reflexão da luz sobre partículas opacas em suspensão como micelas de caseína, glóbulos de gordura, fosfatos e citratos de cálcio, e

pode variar de acordo com o número e tamanho dessas partículas. A presença de poucas partículas grandes como os glóbulos de gordura, como no leite desnatado, por exemplo, faz com que os feixes de luz sejam menos interceptados e a cor do leite tende a azul, de modo que a cor do leite possui grande importância para a indústria leiteira, pois muitas vezes é utilizada como um indicativo de sua riqueza em gordura (RIEL, 1991).

A acidez do leite é sem dúvida a determinação analítica mais frequente na tecnologia leiteira, e seu aumento é um indicativo de alguma anormalidade (RIEL, 1991). Os altos valores de acidez no leite são resultado direto da conversão da lactose em ácido láctico por contaminação microbiológica que implica, de modo indireto, em alta contagem bacteriana (PERES, 2001). No entanto, componentes naturais do leite como dióxido de carbono, fosfatos, citratos e caseínas também contribuem para o aumento da acidez (RIEL, 1991; PERES, 2001). A acidez titulável é expressa em porcentagem de ácido láctico e pode variar de 0,10 a 0,30%, mas de maneira geral o leite bovino apresenta de 0,14 a 0,17% de acidez (CARUSO, OLIVEIRA, 1983; RIEL, 1991). O pH também é outra forma de se conhecer a acidez do leite e seus derivados, sendo que o leite recém-ordenhado apresenta pH levemente ácido, ou seja, pH entre 6,5 e 6,7 (CARUSO, OLIVEIRA, 1983).

O ponto de congelamento (PC) e ebulição do leite estão entre as constantes físicas que apresentam maior estabilidade (RIEL, 1991), pois a pressão osmótica do leite se mantém em equilíbrio com a do sangue (HENNO, et al., 2008; KEDZIERSKA-MATYSEKE, et al., 2011). Essas variáveis possuem relação direta com a concentração de solutos no leite e, portanto, correspondem à medida do número de moléculas ou íons que se encontram em solução na fase aquosa do leite. Na pressão atmosférica normal o ponto de congelamento do leite varia de -0,52 a -0,56°C e o seu ponto de ebulição é de 100,5°C (RIEL, 1991).

A análise do PC é o principal parâmetro utilizado pelos laticínios para verificar fraudes por adição de água no leite, uma vez que a mesma faz aumentar o PC, o que afeta a qualidade de derivados lácteos e aumenta os gastos com a produção (KEDZIERSKA-MATYSEKE, et al., 2011).

Outra variável físico-química que também ajuda a indicar adição de água no leite é a densidade, que neste caso será mais baixa em comparação ao leite cru natural (1,023 – 1,040g/ml) (CEBALLO, HERNÁNDEZ, 2001). No entanto, este não é um teste conclusivo,

pois alterações na densidade pode ser consequência de alterações na composição química do leite (CARUSO, OLIVEIRA, 1983).

Características físico-químicas como calor específico, tensão superficial, viscosidade, condutividade elétrica, índice de refração, pressão osmótica e potencial de óxido redução são dados muito úteis para padronização de processos industriais na indústria leiteira. Através deles é possível calcular a demanda de energia, o conteúdo e grau de homogeneização da gordura, o grau de hidratação das proteínas, detecção da adição de água no leite, concentração de açúcar em derivados, avaliação da qualidade e inibição do crescimento bacteriano, dentre outros (RIEL, 1991).

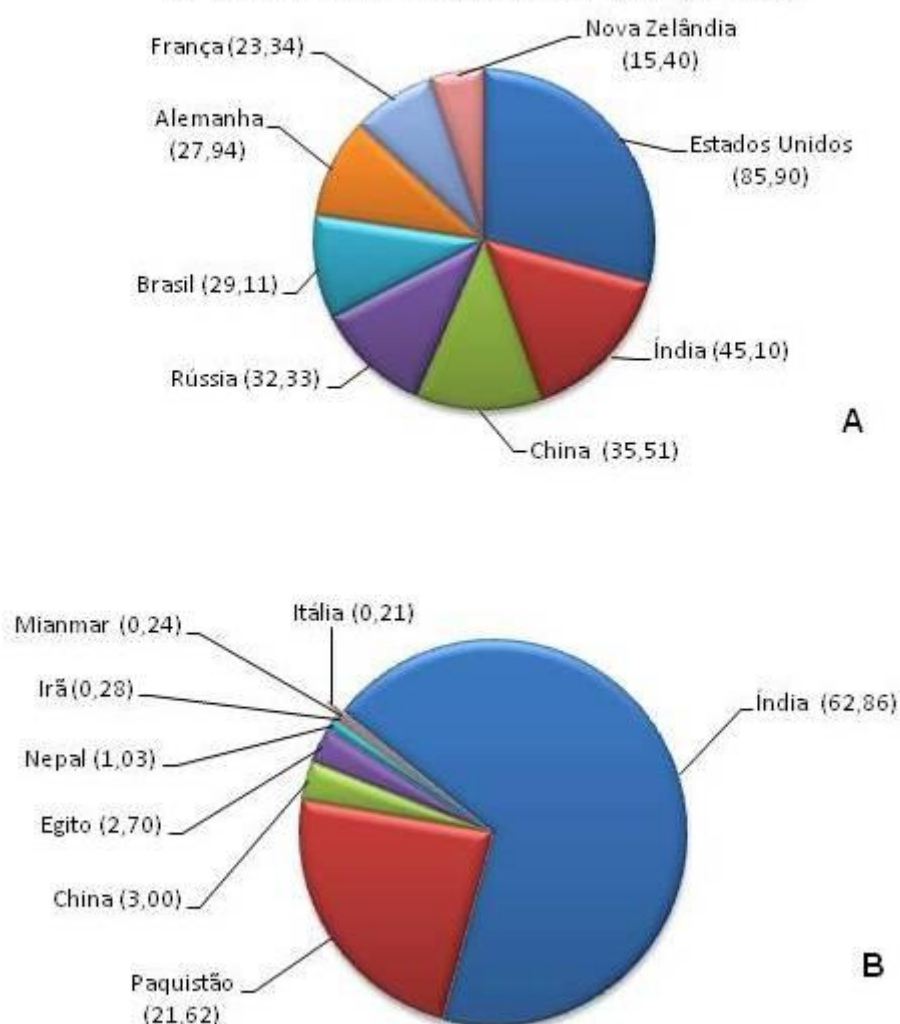
A produção anual de leite no mundo é de aproximadamente 600 milhões de toneladas, dos quais 80% representam o leite de vaca, seguido pelo leite de búfala (12%). A facilidade de converter o leite em uma grande variedade de produtos o enquadra em uma matéria-prima bastante útil para a produção de alimentos, de modo que o leite é motivo de muitos estudos há mais de um século (HUPPERTZ, KELLY, 2009).

2.2 LEITE DE BÚFALA

O rebanho de búfalos no mundo é estimado em 172 milhões de cabeças. Deste total, 96% estão concentrados no continente asiático (PERERA, 2011). Na América Latina, o Brasil é o principal criador que, juntamente com Venezuela e Colômbia, somam-se cerca de 3,5 milhões de bubalinos e o número tende a aumentar, com um crescimento anual estimado em 12,7%, que está bem acima da média dos demais continentes (ZAVA, 2010).

O leite de búfala representa 12% da produção mundial de leite, perdendo apenas para o leite de vaca. Índia e Paquistão são os maiores produtores e juntos somam 80% do volume total produzido, sendo destinado para consumo e produção de derivados lácteos como manteiga, queijos duros e moles, leite em pó, sorvete e iogurte (AHMAD et al., 2008). Na figura 1 está representado o *ranking* dos oito maiores produtores mundiais de leite de vaca e de búfala.

Ranking dos oito maiores produtores mundiais de leite de vaca e de búfala* (FAO/2009)



*valores em milhões de toneladas

Figura 1. Ranking dos oito maiores produtores mundiais de leite bovino e bubalino no ano de 2009. A: leite de vaca; B: leite de búfala. (Fonte: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>).

O leite de búfala representa mais de 50% do leite consumido em países como Índia, Paquistão, Egito e Nepal, enquanto que na Itália, o volume produzido é utilizado quase que exclusivamente para a produção de queijo “mozzarella”, e apesar de possuir uma maior concentração de gordura, apresenta menor teor de colesterol que o leite bovino (275mg/L versus 330mg/L) (ZICARELLI, 2004).

De acordo com Seno (2007), o aumento da demanda de derivados de leite de búfala nas últimas décadas valorizou a espécie bubalina na pecuária leiteira mundial. Os produtores brasileiros notaram o potencial de mercado e passaram a investir na bubalinocultura.

Conforme mencionado, a exploração de bubalinos no Brasil para a produção de leite tem crescido muito nos últimos anos em decorrência de suas características que permitem fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e sensorial (PEREIRA, et al., 2009). Na região Sudeste, maior produtora do país, o leite desta espécie é utilizado quase na sua totalidade para a produção da muçarela, por ter mercado assegurado, preço compensatório e características sensoriais peculiares (MACEDO et al., 2001; SENO et al., 2007). Outros tipos de queijos, como o minas frescal, também são produzidos em menor escala na tentativa de introduzir esta rica fonte de proteína no hábito alimentar brasileiro (YUNES e BENEDET; 2000).

A característica marcante do leite de búfala é a ausência de beta-caroteno, que lhe confere a coloração branca, mas que não prejudica a qualidade nutricional do leite, pois é rico em vitamina A (FIGUEIREDO, 2006) e por possuir maiores teores de proteínas e gorduras possibilita um alto rendimento industrial (OLIVIERI, 2004; PEREIRA JUNIOR et al., 2009), chegando a sobrepujar o rendimento do leite bovino em até 40% (BUZI et al. 2009). Além disso, o leite de búfala é relativamente mais resistente à contaminação microbiológica quando comparado ao leite de vaca, fato que pode estar relacionado à enzima endógena lisozima (BENKERROUM, 2010).

Em estudos realizados por Priyadarshini e Kansal (2002) a atividade antibacteriana de lisozima de búfala foi determinada contra 11 espécies de bactérias, compreendendo Gram-positivas e Gram-negativas, mostrando-se mais efetiva contra o grupo das Gram-positivas. Além disso, o búfalo apresenta rusticidade, capacidade de viver em espaços muitas vezes inacessíveis ao homem e outras espécies, resistência a endo e ectoparasitas e a diversas doenças infectocontagiosas (MALHADO et al., 2008).

Segundo Pereira Júnior et al. (2009), apesar do maior valor nutritivo e rendimento industrial do leite de búfala quando comparado com o leite de vaca, e do crescimento de sua exploração no país, pouco se tem feito para a regulamentação de normas de padrão de

identidade e qualidade do leite bubalino, o que dificulta a realização de medidas de controle e fiscalização.

Trata-se de um alimento altamente nutritivo e benéfico à saúde humana devido ao alto valor biológico de seus componentes. Além da gordura e proteínas, o leite de búfala apresenta maiores percentagens de lactose, sólidos totais e alguns minerais como o cálcio (PEREIRA JR, FERNANDES, 2011; TEIXEIRA, et al., 2005). O conteúdo dos principais componentes e potencial hidrogeniônico (pH) do leite de búfala e de vaca pasteurizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Composição básica e potencial hidrogeniônico do leite de búfala e de vaca pasteurizados.

Tipo de Leite	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos NG* (%)	Cálcio iônico (mg/100mL)	Cálcio total (mg/100g)	pH (25°C)
Búfala	8,39±0,32	4,62±0,04	5,01±0,03	10,3±0,06	4,1±0,1	180±4	6,72±0,02
Vaca	4,20±0,05	3,33±0,04	4,62±0,06	8,63±0,09	4,4±0,2	125±2	6,67±0,01

*NG: não gordurosos. Fonte: HUSSAIN, et al., 2011.

O tamanho médio do glóbulo de gordura do leite bubalino é de 4,07µm enquanto que o bovino é 3,16µm; além disso, no leite bubalino os glóbulos de gordura encontram-se mais distribuídos e em maior frequência. No entanto, variações sazonais e estágio de lactação os afeta diretamente. São constituídos por ácidos graxos saturados (71%) e ácidos graxos insaturados (28,3%) (MENARD, et al., 2010). Na Tabela 3 são representadas as concentrações dos ácidos graxos presentes no leite bovino e bubalino.

Tabela 3. Composição em ácidos graxos do leite bovino e bubalino.

Ácido graxo	Leite Bovino (%)	Leite Bubalino (%)
4:0	2,5 ±0,5	2,8 ±0,5
6:0	2,1 ±0,4	1,9 ±0,3
8:0	1,4 ±0,4	1,1 ±0,2
10:0	2,5 ±0,3	1,8 ±0,3
12:0	2,9 ±0,2	2,3 ±0,2
14:0	11,1 ±0,4	11,8 ±0,2
14:1 <i>c9</i>	1,1 ±0,2	0,7 ±0,01
15:0	1,2 ±0,03	1,74 ±0,08
16:0	33,8 ±0,9	36,0 ±1,2
16:1 <i>c9</i>	1,6 ±0,05	1,9 ±0,02
17:0	0,6 ±0,05	0,8 ±0,02
18:0	11,1 ±0,9	9,9 ±0,2
18:1 <i>c9</i>	22,1 ±1,7	20,3 ±0,7
18:1 <i>t11</i>	0,2 ±0,1	0,1 ±0,03
18:2 <i>c9 t11</i>	0,7 ±0,02	0,9 ±0,1
18:2 <i>c9 c12</i>	1,34 ±0,1	0,9 ±0,1
18:3 n-3	0,6 ±0,03	0,7 ±0,2
20:0	0,1 ±0,06	0,2 ±0,03
SFA	69,6 ±1,7	70,8 ±0,8
CLA	0,7 ±0,02	0,9 ±0,1

SFA: saturated fatty acids (ácidos graxos saturados), *CLA*: conjugated linoleic acid (ácido linoléico conjugado).

Fonte: MENARD, et al. 2010.

Em estudos realizados por Colarow et al. (2003), o leite de búfala apresentou gangliosídeos bioativos com propriedades antiinflamatórias, que não foram encontrados no leite de vaca.

As principais proteínas presentes no leite de búfala são: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, e por possuir uma maior quantidade de κ -caseína em relação ao leite de vaca, o processo de coagulação do leite bubalino é acelerado, exigindo uma menor quantidade de quimosina para a fabricação de queijos. A concentração relativa das soro proteínas é muito semelhante nas duas espécies, e tanto para o soro do leite bovino quanto para o soro do leite bubalino, a β -lactoglobulina (β -Lg) está presente em maior quantidade (~50%), seguida pela α -lactoalbumina (α -La) e soro albumina (SA). Há também proteínas em quantidades menores como lactoferrina, imunoglobulinas, lactoperoxidase, lisozimas, lípases, proteases, entre outras (EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2011). Além disso, em recente estudo realizado por Sheehan e Phipatanakul (2009), verificou-se que indivíduos com alergia ao leite de vaca são capazes de tolerar o leite bubalino,

aumentando assim seus benefícios nutricionais. A Tabela 4 exibe a concentração e algumas propriedades das principais proteínas do leite de búfala.

Tabela 4. Concentração e algumas propriedades das principais proteínas do leite bubalino.

Proteína	Concentração	Variantes genéticas	pI (20°C)	MM (kDa)	Referência
α_{s1} -caseína	8,89±2,15 ^a	A,B	4,24 – 4,63	22,77	(Felgini et al. 2009)
α_{s2} -caseína	5,08±1,56 ^a	-	4,84 - 5,13	24,70	(Felgini et al. 2009)
β -caseína	20,91±0,75 ^a	A,B	4,55 – 5,09	23,58	(Felgini et al. 2009)
κ -caseína	4,13±1,53 ^a	-	4,80 – 6,85	19,25	(Felgini et al. 2009)
β -lactoglobulina	7,7 ^b	A,B,C	4,71 – 6,77	18, 29	(D'Ambrosio et al.2008)
α -lactoalbumina	4,8 ^b	A,B	4,55 – 4,66	14, 24	(D'Ambrosio et al.2008)
Soro albumina	10,0 ^b	-	4,44 – 4,74	69,29	(D'Ambrosio et al.2008)

pI: ponto isoelétrico, MM: massa molar; ^a gramas por litro de leite desnatado; ^b porcentagem total de absorbância em gel.

A composição em minerais apresenta uma elevada concentração de cálcio (Ca), quantidades significativas de fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K) e traços de zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), boro (B), manganês (Mn), cobalto (Co), cádmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni) e selênio (Se). Quanto às vitaminas, possui valores maiores para vitamina A e C quando comparado com o leite de vaca, e apresenta conteúdos menores de vitamina E. Há também a presença em pequenas quantidades de vitaminas B₁, B₂, B₃, B₉, B₈. Porém, a concentração de vitamina B₁₂ é cerca de quatro vezes maior no leite de búfala do que no leite de vaca (EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2011).

Em relação às propriedades físicas, o leite de búfala apresenta maior viscosidade, que é um parâmetro altamente dependente do teor de gordura do leite; apresenta uma densidade de aproximadamente 1,032 g/L, ponto de congelamento entre -0,518°C e -0,590°C e uma condutividade elétrica de 0,5689 W/m-K a 42-43°C. Quando comparado ao leite de vaca, apresenta uma maior capacidade tamponante devido a uma maior concentração de caseína e fosfato inorgânico (EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2011).

2.3 SORO DO LEITE BOVINO

2.3.1 Generalidades

O soro de leite é o co-produto obtido a partir da produção de queijos, onde para cada quilo de queijo produzido cerca de nove quilos de soro são gerados (SISO, 1996). O soro pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: o enzimático (coagulação pela quimosina), a precipitação ácida (adição de ácido até o ponto isoelétrico das caseínas) e separação física das micelas de caseína por microfiltração (SGARBIERI, 2004).

A composição do soro varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte sólida), sendo que, deste total, 71% é lactose, 10% proteína bruta (PB), 12% gordura e 7% sais minerais (LIZIEIRE E CAMPOS, 2000).

A utilização e/ou descarte do soro é uma das principais preocupações para os especialistas em leite de todo o mundo, porque este fluido lácteo contém constituintes valiosos que não devem ser desperdiçados e, além disso, representa um importante poluente ambiental (EL-SALAM, et al. 2009)

Há estimativas que a cada ano são produzidos no mundo 100 bilhões de litros de soro pelas indústrias de laticínios, sendo que cerca de 40% do volume total são descartados no meio ambiente sem nenhum tratamento, causando um grande impacto ambiental (MARQUES et al., 2005) relacionado à elevada demanda biológica de oxigênio (DBO), que é cerca de 30.000 a 50.000 mg.L⁻¹. Tal índice é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico e, considerando uma produção média de 10⁴ L de soro por dia, esta teria o poder poluente equivalente ao de uma população de 5.000 habitantes (MACHADO et al., 2001; LIRA et al., 2009).

A descoberta das propriedades funcionais do soro do leite, assim como sua aplicação nutricional, fez com que essa fração fosse “promovida” a um co-produto da fabricação de queijos, e não mais um subproduto (WALZEM, et al., 2002). Aproximadamente 55% dos nutrientes presentes no leite ficam retidos no soro durante a fabricação de queijos (STANTON, et al., 2002; SÁNCHEZ, et al. 2011). Dentre os constituintes do soro do leite, os mais abundantes são lactose, proteínas solúveis (20%) e lipídeos, dos quais as proteínas são o principal alvo de estudos. As principais proteínas são: β -lactoglobulina (β -Lg),

α -lactoalbumina (α -La), soro albumina (SA) e imunoglobulinas (Ig) (ANTUNES, 2003; MARQUES et al., 2005). Há também proteínas em menores quantidades como lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima, que são conhecidas por suas propriedades antibacterianas (BUFFONI et al., 2011). Essas proteínas são ricas em aminoácidos essenciais e fontes potenciais de peptídeos bioativos (ISMAIL, et al. 2011).

2.3.2 Proteínas do soro: aspectos gerais

Proteínas do soro do leite correspondem a 20% do total das proteínas presentes no leite de vaca e de búfala (AKHAVAN, et al. 2010) e representam um grupo heterogêneo onde destacam-se a β -lactoglobulina (55%), α -lactoalbumina, imunoglobulinas (15%) e soro albumina (5%), e várias outras proteínas em menor concentração (lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, entre outras), cada qual com sua funcionalidade (EL-SALAM, et al. 2009), e são caracterizadas pelo alto valor nutricional, funcional e biológico (CONTRERAS, et al. 2011). As proteínas do soro do leite são globulares e compactas (variam de 14 a 100 kDa) e são universalmente definidas como aquelas proteínas que permanecem no soro após a coagulação das caseínas em pH 4,6 a 20° C (MORR E HA, 1993; IMAFIDON, 1997).

Do ponto de vista aminoacídico (aminoácidos essenciais), as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que não aparecem em quantidade excessiva, mas atendem às recomendações estabelecidas pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO). Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Devido à presença abundante de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e principalmente à elevada concentração de leucina, essas proteínas despertam grande interesse, pois esse aminoácido essencial está diretamente relacionado à síntese proteica muscular (HA e ZEMEL, 2003).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, o que estimula a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais (BOUKHETTALA, et al., 2010) a tal ponto que pesquisas as classificam como proteínas de metabolização rápida

(*fast metabolizing proteins*), muito adequadas para situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torne emergencial (SGARBIERI, 2004). Além disso, as soro proteínas do leite e seus peptídeos são cruciais na imunidade inata para a progênie (BUFFONI, et al., 2011).

Estudos em humanos indicam que um aumento da saciedade pode estar relacionado à ingestão de proteínas do soro do leite, suprimindo a ingestão de alimentos e quando consumidas juntamente com uma dieta rica em carboidratos, são capazes de reduzir a resposta glicêmica subsequente (AKHAVAN, et al. 2010).

De acordo com suas características funcionais, as soro proteínas são largamente utilizadas pela indústria de alimentos na produção de fórmulas infantis, panificação, embutidos, sorvetes, bebidas lácteas, leites fermentados, entre outros (HARAGUCHI et al., 2009; LIRA et al., 2009; XU, et al. 2011).

Com o desenvolvimento de técnicas como a ultrafiltração e uso de métodos cromatográficos tornou-se possível a recuperação e fracionamento das proteínas do soro do leite em suas formas nativas, disponibilizando no mercado uma grande variedade de produtos como concentrados (35-80% de proteínas) e isolados proteicos (teor mínimo de proteínas de 90%), frações proteicas (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidase) e hidrolisados proteicos (EL-SALAM, et al., 2009). Suplementos com proteínas do soro e suas frações, tem-se tornado popular entre os esportistas e pessoas interessadas em ganhar massa muscular. A ingestão dietética atual de proteínas para a população em geral é de 0,8g/Kg de peso corporal/dia; já para aqueles indivíduos envolvidos na prática regular de exercícios esse valor passa a 1,2 – 1,7g de proteína/Kg de peso corporal/dia (APARICIO, et al. 2010).

Como gênero alimentício, além de possuírem propriedades tecnológicas únicas (emulsificante, espumante, bactericida), são também utilizadas devido ao seu elevado valor nutritivo e ser classificadas como produtos “GRAS” (Generally Recognized As Safe – Genericamente reconhecido como seguro) (EL-SALAM, et al., 2009). Na Tabela 5 estão representadas algumas propriedades funcionais de frações proteicas do soro do leite.

Tabela 5. Propriedades funcionais de algumas frações proteicas do soro do leite.

Fração proteica	Espumante		Emulsificante		Gelificante	Solubilidade
	capacidade	estabilidade	capacidade	Estabilidade		
β – Lg ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++
α – La ^b	+++	+++	+++	+++	-	+++
SA ^c	+	+	+	+	+++	+++
Ig ^d	-	-	-	-	+++	+++
GMP ^e	+++	+	+	+	-	+++

^a β -Lactoglobulina; ^b α -Lactoalbumina; ^coroalbumina; ^dimunoglobulina; ^eglicomacropéptídeos.

+++ ótimo; + regular; - ruim. Fonte: EL-SALAM, et al., 2009

2.3.3 Proteínas do soro do leite de búfala

As soro proteínas do leite bovino são extensivamente estudadas, principalmente por suas propriedades funcionais e nutricionais. No que diz respeito às proteínas do soro do leite bubalino ainda há uma substancial falta de caracterização e particularmente sobre aspectos quantitativos (BUFFONI, et al. 2011). Pesquisas utilizando proteínas do leite de búfala como fonte de peptídeos bioativos tem recebido menor atenção em relação às proteínas do leite de vaca. Com base na similaridade das sequências de aminoácidos da β -Lg e α -La de búfalas e vacas, espera-se a obtenção de peptídeos bioativos semelhantes, mas nenhuma literatura sobre peptídeos bioativos de proteínas do soro do leite bubalino tem sido citada. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias a fim de se explorar plenamente essas proteínas como fontes potenciais de peptídeos bioativos (EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2011).

2.4 HIDROLISADOS PROTÉICOS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS

O tratamento enzimático contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, nutricionais e principalmente na melhoria da capacidade de absorção das proteínas (BIASUTTI, et al. 2008).

Devido às suas excelentes propriedades funcionais (seletividade, atividade e especificidade), as enzimas são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos em condições experimentais e ambientais amenas (pH e temperatura) e controladas (GUISÁN, 2006)

A hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite vem sendo utilizada principalmente para reduzir problemas com alergenicidade e/ou produzir peptídeos bioativos. Além disso, a hidrólise também é largamente utilizada pela indústria de alimentos para

modificar e melhorar as propriedades funcionais do soro do leite. Dentre elas temos: modificações na capacidade de geleificação, melhoria na estabilidade térmica, mudanças na solubilidade, estabilidade e capacidade de formar espuma, melhoria da capacidade emulsificante e adequação da funcionalidade da proteína para atender necessidades específicas. Cabe ressaltar que o grau desejado de hidrólise e a fonte adequada de proteína dependem do método aplicado para clivar as ligações peptídicas que varia de acordo com funcionalidade requerida e do tipo de produto em que serão incorporados (ROCHA, et al. 2010).

Extensas pesquisas estão sendo realizadas com proteínas e seus derivados; dentre esses, os mais estudados são os peptídeos. Proteínas do leite é a fonte mais importante de peptídeos biologicamente ativos, embora haja outras fontes proteicas animais e vegetais com potenciais sequências bioativas de aminoácidos (NAGPAL, et al. 2011).

O termo bioativo refere-se a compostos que tanto podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou serem formados durante o processamento de alimentos com possíveis funções fisiológicas e/ou bioquímicas quando ingeridas por seres humanos (PARK, 2009).

Alimentos funcionais e compostos bioativos em alimentos têm atraído o interesse dos cientistas de alimentos, nutricionistas, profissionais da saúde e consumidores em geral, pois são responsáveis por trazer benefícios à saúde, suprimento das funções nutricionais básicas (PARK, 2009) e reduzir a epidemia mundial de doenças crônicas que respondem por 58 milhões de mortes prematuras a cada ano, mas além dos benefícios à saúde, proteínas com propriedades funcionais e peptídeos bioativos são uma categoria importante dentro do setor de alimentos nutracêuticos, onde o volume de vendas está avaliado em cerca de US\$ 75 bilhões/ano. Este é um mercado dinâmico que está em franco crescimento (MINE, et al. 2010; HERNÁNDEZ-LEDESMA, et al. 2011).

Estudos demonstram que peptídeos bioativos do soro de leite são capazes de modular algumas respostas fisiológicas no organismo animal (BIASUTTI et al., 2008). Dentre elas, as mais importantes e estudadas são: efeito insulínico, atividade antioxidante, efeitos imunomoduladores, atividade opióide, anticarcinogênica e antihipertensiva (GERDES, et al., 1999; MARSHALL, 2004; PETERSEN et al., 2009; LEKSRIOMPONG et al., 2010).

Para obter peptídeos bioativos do soro através de métodos *in vitro*, a hidrólise enzimática é geralmente o método de escolha, uma vez que pode minimizar o impacto do pH e uso de temperatura extremos que levam a diferentes graus de desnaturação proteica com perda de suas funções biológicas (LEKSRI SOMPONG et al, 2010). A simulação da digestão fisiológica com diferentes enzimas presentes no trato gastrointestinal como a pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase é uma ferramenta muito útil para liberar peptídeos com número de resíduos de aminoácidos variados (HERNÁNDEZ-LEDESMA, et al. 2011) ao mesmo tempo em que avalia a estabilidade de peptídeos bioativos contra as enzimas digestivas, tem em vista que essas sequências de aminoácidos bioativos devem permanecer ativos e intactos durante a digestão e absorção gastrointestinal, ou seja, serem capazes de atravessar o epitélio intestinal, entrar na corrente sanguínea e potencialmente exercer seus efeitos fisiológicos ao atingir o órgão-alvo (SEGURA-CAMPOS, et al. 2011).

Segundo Domínguez-González et al. (2010), a biodisponibilidade é um fator importante na alimentação porque varia de acordo com diferentes alimentos, componentes alimentares e condições gastrointestinais. A biodisponibilidade depende de vários processos como a digestão, transporte, absorção, utilização e eliminação de nutrientes.

Para estimar a biodisponibilidade de nutrientes em nutrição humana, métodos *in vitro* têm sido propostos e são geralmente baseados na simulação da digestão gastrointestinal e medem a fração do elemento estudado disponível para absorção (DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, et al. 2010).

Esses métodos têm sido muito importantes quando se busca prever a biodisponibilidade de muitos compostos presentes em novos alimentos ou alimentos biofortificados. Sua utilização visa uma triagem simples e rápida, sendo um método bastante confiável e utilizado antes de estudos *in vivo*, que normalmente empregam técnicas caras e de difícil execução (ARGYRI et al., 2011). Neste método, membranas de diálise com porosidade conhecida são utilizadas e as condições experimentais simulam a digestão gastrointestinal com o uso de enzimas gástricas como pepsina, pancreatina e sais biliares, além de pHs e temperatura controlados (ROMARÍS-HORTAS, et al. 2011).

Outro método *in vitro* bastante utilizado para se avaliar a absorção de nutrientes em nível intestinal envolve cultura de células, em especial células de câncer de cólon humano

(Caco-2) devido sua semelhança com células epiteliais do intestino (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). Neste método, as células Caco-2 são cultivadas até formarem uma monocamada, e quando atingem a confluência, elas espontaneamente se diferenciam e adquirem características morfo-funcionais de enterócitos, podendo assim “quebrar” moléculas e transportá-las para dentro dos tecidos (SEGURA-CAMPOS, et al. 2011). Estudos realizados mostraram que resultados obtidos *in vitro* podem ser correlacionados com a biodisponibilidade e bioacessibilidade de determinados nutrientes ensaiados *in vivo*. Constituem ferramentas úteis para estabelecer tendências, comparações e possíveis transformações durante o processo de digestão (VELASCO-REYNOLD, et al. 2010).

2.5 PROTEASES DIGESTIVAS: PEPSINA, TRIPSINA, QUIMOTRIPSINA E CARBOXIPEPTIDASE-A.

Proteases (EC 3.4) são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (SANTOS; KOBLITZ, 2008). Estudos iniciaram-se no fim do século XVI, devido ao grande interesse na compreensão da fisiologia do sistema gastrointestinal humano, mas existem relatos empíricos na antiguidade, em que tecidos animais, vegetais e outros materiais biológicos ricos em proteases já eram utilizados na produção de queijos e tratamento de couros. Dessa forma, as proteases foram as primeiras enzimas com aplicação tecnológica (VERMELHO, et al.2008).

A escolha das proteases, condições de digestão e o método usado para análise dos hidrolisados proteicos tem um considerável impacto sobre a digestibilidade das proteínas. A partir disso, muitos métodos *in vitro* que simulam o processo de digestão vem sendo utilizados e as enzimas mais testadas são pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase (HUR, et al, 2011).

A pepsina é uma aspártico-protease produzida pelo estômago sob a forma inativa, o pepsinogênio. Na mucosa gástrica, com a liberação de ácidos, é rapidamente ativada em pH < 4,5; no entanto, são facilmente desnaturadas em pH > 7,0. Hidrolisam preferencialmente a ligação peptídica localizada no lado N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos leucina e fenilalanina. Possuem atividade ótima em um intervalo de pH 1,8-3,5 (ROBERTS, 2006; WHITCOMB, et al. 2007; LÓPEZ-FERRER, et al. 2011).

Tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase são secretadas pelo pâncreas como pró-enzimas inativas, ou seja, zimogênios. Entre elas três formas de tripsina, quimotripsinogênio A e B e procarboxipeptidase A₁, A₂, B₁ e B₂ (WHITCOMB, et al. 2007).

A tripsina é a mais importante de todas as enzimas digestivas, pois desempenha um papel fundamental na regulação de todas as outras enzimas digestivas. É uma endopeptidase, da classe das serina-proteases, que cliva o lado carboxila dos resíduos de arginina e lisina. Do total de enzimas presentes no suco pancreático é a mais abundante (19%). Sua forma inativa é denominada tripsinogênio, e permanece inativo até que atinja o duodeno, onde é ativado pela enteroquinase, embora evidências atuais indiquem que a tripsina é ativada pela própria tripsina e inativada por um processo de autólise. Seu pH ótimo de ação está entre 7,5 e 8,5 (WHITCOMB, et al. 2007).

A quimotripsina é a segunda serina-protease mais abundante e representa cerca de 9% do total de enzimas secretadas pelo pâncreas. Trata-se de uma endopeptidase que hidrolisa peptídeos cujas cadeias laterais contenham aminoácidos aromáticos como a tirosina, triptofano e fenilalanina. Como quimotripsinogênio, é ativada pela tripsina (WHITCOMB, et al. 2007).

Diferentemente da tripsina e quimotripsina, a carboxipeptidase é uma metaloprotease que contém um átomo de zinco em seu sítio ativo. É uma exopeptidase capaz de clivar o lado C-terminal das cadeias peptídicas, e como a quimotripsina, sua ativação se dá pela tripsina (WHITCOMB, et al. 2007).

Hoje, com os avanços em genômica, a partir do sequenciamento do genoma humano, descobriu-se que mais de 2% dos nossos genes são responsáveis por codificar proteases, sugerindo que essas enzimas possuem funções muito mais complexas, além daquelas envolvidas em nosso processo de digestão gastrointestinal. Já se sabe, por exemplo, que proteases regulam fatores de crescimento, produção de citocinas, ativação e inativação de sinalizadores celulares e estão presentes até mesmo na regulação dos genes (CRAIK, et al, 2011). Por serem indispensáveis à vida, as proteases são produzidas por todos os seres vivos, ou seja, animais, vegetais e microrganismos (SANTOS; KOBLITZ, 2008).

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD,S.; GAUCHER, I.; ROUSSAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J.F.; GAUCHERRON, F. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food Chemistry**, v. 106, p. 11-17, 2008.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. 1.ed. Barueri: Manole, 2003. 135p.

APARÍCIO, V.A.; NEBOT, E.; PORRES, J.M.; ORTEGA, F.B.; HEREDIA, J.M.; LOPEZ-JURADO, M.; RAMÍREZ, P.A. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. **British Journal Nutrition**, p.1-10, 2010.

ARGYRI, K.; THEOPHANIDI, E.; KAPNA, A.; STAIKIDOU, C.; POUNIS, G.; KOMAITIS, M.; GEORGIU, C.; KAPSOKEFALOU, M. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. **Food Chemistry**, v.127, p. 716 – 721, 2011.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.3, p. 320-338, ago. 2010.

BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; LOPES JÚNIOR, C.O.; COELHO, V.; SILVA, V.D.M; SILVESTRE, M.P.C. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1, p. 51-60, 2008.

BLYTH, A.W. The composition of cow's milk in health and disease. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v.35, p.530-539, 1879.

BOUKHETTALA, N.;IBRAHIM, A.; AZIZ, M.; VUICHOUD, J.; SAUDAN, K. Y.; BLUM, S.; DÉCHELOTTE, P.; BREUILLÉ, D.; COËFFIER, M. A diet containing whey protein, free glutamine, and transforming growth factor- β ameliorates nutritional outcome and intestinal

mucositis during repeated chemotherapeutic challenges in rats. **The Journal of Nutrition - Nutrition and Disease**. p. 1-7, jan. 2010

BUFFONI, J.N.; BONIZZI, I.; PAUCIULLO, A.; RAMUNO, L.; FELIGINI, M. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Food Chemistry**, v.127, p. 1515 – 1520, 2011.

BUZI, K.A.; PINTO, J.P.A.N.; RAMOS, P.R.R.; BIONDI, G.F. Microbiological analysis and electrophoretic characterization of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1, p.7-11, jan./mar., 2009.

CEBALLO, P.P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso de leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, 72p.

COLAROW, L.; TURINI, M.; TENEBERG, S.; BERGER, A. Characterization and biological activity of gangliosides in buffalo milk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1631, p.94-106, 2003.

CONTRERAS, M.M; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **Food Science and Technology**, v.44, p.9-15, 2011.

CRAIK, C.S.; PAGE, M.J.; MADISON, E.L. Proteases as therapeutics. **Biochemical Journal**, v.435, p.1-16, 2011.

D'AMBROSIO, C.; ARENA, S.; SALZANO, A.M.; RENZONE, G.; LEDDA, L.; SCALONI, A. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. **Proteomics**, v.8, p.3657-3666, 2008.

DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCIA-SARTAL, C.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BARCIELA-ALONSO, M.C.; BERMEJO-BARRERA, P. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. **Talanta**, v.82, p.1668-1673, 2010.

EL-SALAM, M.H.A; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science and Technology**, v.91, p.663-699, 2011.

ELWOOD, P.C.; PICKERING, J.E.; HUGHES, J.; FEHILY, A.M.; NESS, A.R. Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke II. Evidence from cohort studies. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.718-724, 2004.

FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; BUFFONI, J.N.; COSENZA, G.; RAMUNNO, L. Identification and quantification of α_{S1} , α_{S2} , β , and κ -caseins in water buffalo milk by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.2988-2992, 2009.

FIGUEIREDO, E.L. **Elaboração e caracterização do “Queijo Marajó”, tipo creme, de leite de búfala, visando sua padronização**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

GERDES, S.K; HARPER, W.J; MILLER, G. Componentes bioativos de soro e a saúde cardiovascular. **USDEC**, 1999.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso de leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, 72p.

GUISÁN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Humana Press 2ªed., 2006, 449p.

HÁ, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.251-258, 2003.

HARAGUCHI, F.K.; PEDROSA, M.L.; PAULA, H.; SANTOS, R.C.; SILVA, M.E. Influence of whey protein on liver enzymes, lipid profile and bone formation of hypercholesterolemic rats. **Rev. Nutr**, Campinas, v. 22, n.4, p. 517-525, jul./ago. 2009.

HAUG, A.; HØSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, Oslo, v.6, n. 25, p. 1-16, 2007.

HENNO, M.; OTS, M.; JÕUDU, I.; KAART, T.; KÄRT, O. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, v.18, p.210-215, 2008.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M.M.; RECIO, ISIDRA. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p.23-35, 2011.

<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> . Food and Agricultural commodities production. Acesso em: 12 set 2011.

HUPPERTZ, T.; KELLY, A.L. Properties and Constituents of Cow's Milk. In: TAMIME, A.Y. (Ed). **Milk Processing and Quality Management**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. cap.2, p.23 - 47.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v.125, p.1-12, 2011.

HUSSAIN, I.; BELL, A.E.; GRANDISON, A.S. Comparison of the rheology of mozzarella-type curd made from buffalo and cow's milk. **Food Chemistry**, v.128, p.500 – 504, 2011.

IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A. M. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Critical Review Food Science**, v.37, p.663-689, 1997.

ISMAIL, M.; AMMAR, E.T.; EL-METWALLY, R. Improvement of low fat mozzarella cheese properties using denatured whey protein. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.2, p.207-217, 2011.

KEDZIERSKA-MATYSEK, M.; LITWINCZUK, Z.; FLORER, M.; BARLOWSKA, J. The effects of breed and other factors on the composition and freezing point of cow's milk in Poland. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, p.1-7, 2011.

LEKSRIOMPONG, P.P.; MIRACLE, R.E.; DRAKE, M. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.58, n.10, p. 6318-6327, 2010.

LIRA, H. L.; SILVA, M.C.D.; VASCONCELOS, M.R.S.; LIRA, E.L.; LOPEZ, A.M.Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Rev.Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 33-37, jan.-mar. 2009.

LIZIEIRE, R.S.; CAMPOS, O.F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. **Embrapa gado de leite.**, Rio, p.46, 2000. Disponível em: < <http://www.cnp.gl.embrapa.br/pastprod/textos/folha46.html> > Acesso em: 04 set. 2011.

LÓPEZ-FERRER, D.; PETRITS, K.; ROBINSON, E.W.; HIXSON, K.K.; TIAN, Z.; LEE, J.H.; LEE, S.W.; TOLIC, N.; WEITZ, K.K.; BELOV, M.E.; SMITH, R.D.; PASA-TOLIC, L. Pressurized pepsin digestion in proteomics: an automatable alternative to trypsin for integrated top-down bottom-up proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v.10, n.2, 2011.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, A.A.; AMARAL, J.B.; SOUZA, J.C.; RESENDE, F.D.; OLIVEIRA, J.V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas

da raça mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.1084-1088, 2001.

MACHADO, R. M. G.; SILVA, P. C.; FREIRE, V. H. Controle Ambiental em indústrias de laticínios. **Brasil Alimentos**, Março/Abril, p. 34-36, 2001.

MALHADO, C.H.M.; RAMOS, A.A.; CARNEIRO, P.L.S; AZEVEDO, D.M.M.R; MARTINS FILHO, R.; SOUZA, J.C. Melhoramento e Estrutura Populacional em Bubalinos da Raça Mediterrâneo no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p. 215-220, 2008.

MARSHALL, K.; Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review**. v.9, n.2, p.136-156, 2004.

McCLELLAN, H.L.; MILLER, S.J.; HARTMANN, P.E. Evolution of lactation: nutrition *v.* protection with special reference to five mammalian species. **Nutrition Research Reviews**, v.21, p.97-116, 2008.

MÉNARD, O.; AHMAD, S.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BION, V.; GAUCHERON, F.; LOPEZ, C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, v.120, p.544-551, 2010.

MILLS, S.; ROSS, R.P.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. **International Dairy Journal**, v.2, p.377- 401, 2011.

MINE, Y.; LI-CHAN, E.C.Y.; JIANG, B. Biologically Active Food Proteins and Peptides in Health: An Overview. In: MINE, Y.; LI-CHAN, E.C.Y.; JIANG, B (1ªEd.). **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. Singapura: Wiley – Blackwell, 2010. cap.1, p. 5-11.

MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p. 431-476, 1993

NAGPAL, R. et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. **Food & Function**., v.2, p. 18-27, 2011

OLIVIERI, D. A. **Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*)**. Piracicaba, 2004. 61p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PARK, Y. W. Overview of Bioactive Components in Milk and Dairy Products. In: PARK, Y. W. (1ª Ed). **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**. Singapura: Wiley – Blackwell, 2009. cap.1, p. 3-12

PEREIRA JÚNIOR, J.B.; FERNANDES, K.G.; MÜLLER, R.C.S. Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da Ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 32, n.9, p. 2333-2335, 2009.

PEREIRA JÚNIOR, J.B.; FERNANDES, K.G. Studying the distribution of selenium in buffalo and cow's milk whey. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.5, p.884 – 890, 2011.

PERERA, B.M.A.O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.194 – 199, 2011.

PERES, J.R. O leite como ferramenta de monitoramento nutricional. In: In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso de leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, 72p.

PETERSEN, B.L.; WARD, L.S.; BASTIAN, E.D; JENKINS, A.L.; CAMPBELL, J. VUKSAN, V. A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. **Nutrition Journal**, v. 8, n.47, p.1-5, out. 2009.

PRIYADARSHINI, S., KANSAL, V. Purification, characterization, antibacterial activity and N-terminal sequencing of buffalo-milk lysozyme. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 419-431, 2002.

RICHMOND, H.D. The composition of milk and milk products. **Analyst**, v.23, p.89-92, 1898.

RIEL, R. Composición y estructura físico-química de la leche. In: AMIOT, J. (Ed). **Ciencia y Tecnología de la Leche**. Zaragoza: Acribia, 1991, cap1, p.1 -53.

ROBERTS, N.B. Review article: human pepsins – their multiplicity, function and role in reflux disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.24, p.2-9, 2006.

ROCHA, C.; GONÇALVES. M.P.; TEIXEIRA, J.A. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.46, p.505-511, 2011.

ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; BARCIELA-ALONSO, M.C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. **Food Chemistry**, v.124, p.1747-1752, 2011.

SAMARANAYAKA, A.G.P; LI-CHAN, E.C.Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v.3, p. 229-254, 2011.

SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J.M.; RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.103, p.147-155, 2011.

SANTOS, L.F.; KOBLITZ, M.G.B. Proteases. In: KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008. Cap.3, p.77-106.

SEGURA-CAMPOS, M. et al. Bioavailability of Bioactive Peptides. **Food Reviews International**, v.27, p. 213-226, 2011.

SENO, L.O.; CARDOSO, V.R.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2016-2022, 2007.

SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.645-656, 2005.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n 4, p. 397-409, out./dez., 2004.

SHEEHAN, W.J.; PHIPATANAKUL, W. Tolerance to Water Buffalo Milk in a Child with Cow Milk Allergy. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.102, n.4 p.349, 2009.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

STANTON,C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J.; O'CONNOR, P. Development of Technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Products Research Centre.**, Moorepark, Fermoy, 2002.

TEIXEIRA, L.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lacteos, tecnología química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995. 476 p.

VELASCO-REYNOLD, C.; NAVARRO-ALARCON, M.; SERRANA, H.L.G; PEREZ-VALERO, V.; AGIL, A.; LOPEZ-MARTINEZ, M.C. Dialysability of magnesium and calcium from hospital duplicate meals: influence exerted by other elements. **Biological Trace Element Research**, v.133, p.313-324, 2010.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N; SÁ, M.H.B.; SANTOS, A.L.S.; d'AVILA-LEVY, C.M.; COURI, S.; BON, E.P.S. Enzimas Proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: BOM, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap.11, p.173-287.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.42, p.353-375, 2002.

WHITCOMB, D.C.; LOWE, M.E. Human Pancreatic Digestive Enzymes. **Digestive Diseases and Science**, v.52, p.1-17, 2007

XU, D.; YUAN, F.; JIANG, J.; WANG, X; HOU, Z.; GAO, Y. Structural and conformational modification of whey proteins induced by supercritical carbon dioxide. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, p.32-37, 2011.

YUNES, V. M.; BENEDET, H. D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 285- 290, 2000.

ZAVA, M.A. Buffalo production in America. In: 9th World Buffalo Congress, 2010, Buenos Aires. **Anais...** p. 1036 -1042.

ZICARELLI, L. Buffalo milk: Its properties, dairy yield and mozzarella production. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.127 – 135, 2004

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BUBALINO E DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS POR DIALISABILIDADE

JULIANA CRISTINA BASSAN, RUBENS MONTI, ANTONIO JOSÉ GOULART

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

RESUMO

O leite de búfala representa 12% da produção mundial de leite, com maiores teores de proteínas e gorduras que o de vaca. O soro de leite é o co-produto da indústria queijeira que vem sendo, muitas vezes, descartado no meio ambiente, causando grande impacto ambiental em função de sua constituição rica em proteínas e lactose. Hidrólise enzimática é um avanço tecnológico importante por melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dessas proteínas. O objetivo do trabalho foi produzir hidrolisados proteicos a partir das proteínas presentes no soro do leite de búfala e simular a digestão *in vitro* pelo método da dialisabilidade. O soro lácteo bubalino foi dialisado para retirada de lactose e pequenos peptídeos e aminoácidos, e tratado com caulim para adsorção da gordura. Os produtos de médio e alto grau de hidrólise foram obtidos por ação da pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A em pHs e temperaturas específicos, adicionados ao soro conjuntamente e em separado, em diferentes tempos de hidrólise. A determinação quantitativa de proteínas, aminoácidos, lactose e gordura foram realizadas segundo os métodos Bradford (1976), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Miller (1959) e Gerber, respectivamente. A caracterização qualitativa das proteínas e produtos de hidrólise fez-se por eletroforese não-desnaturante (PAGE) e desnaturante (SDS-PAGE). Os ensaios de biodisponibilidade dos produtos de hidrólise foram realizados pelo método *in vitro* da dialisabilidade segundo metodologia descrita por Luten et al. 1996. Os resultados encontrados para o soro deslactosado e desengordurado foram 6,53g prot.L⁻¹, redução de 99% de lactose e < 0,10 % de gordura. Bandas proteicas com massas molares e migrações relativas (R_m) semelhantes às

do soro bovino foram observadas por SDS-PAGE. Entretanto, no soro bubalino detectou-se uma banda proteica com R_m de 0,73 que não é encontrada no bovino. A α -lactoalbumina e β -lactoglobulina foram as mais resistentes à hidrólise prolongada; no entanto, com tempos maiores de hidrólise houve aumento de peptídeos de baixa massa molar e aminoácidos. O soro lácteo bubalino mostrou ser uma fonte de aminoácidos essenciais como a leucina, lisina, fenilalanina, histidina, treonina e arginina. A concentração relativa de aminoácidos dialisáveis para o soro lácteo bubalino não hidrolisado, de médio e alto grau de hidrólise foram 4448,516 nM, 4548,052 nM e 4735,373 nM, respectivamente. O soro do leite de búfala contém quantidade significativa de proteínas disponíveis que poderão ser utilizadas como suplementação alimentar e fins tecnológicos com significativa concentração de aminoácidos essenciais.

PALAVRAS-CHAVE: biodisponibilidade, dialisabilidade, proteínas do soro do leite, leite de búfala.

INTRODUÇÃO

O soro do leite é um co-produto prontamente obtido a partir da produção de queijos. Trata-se de uma solução amarelo-esverdeada composta por água, lactose, proteínas e sais minerais (AKHAVAN, et al, 2010; FOUCQUIER, et al. 2012) e representa cerca de 85-90% o volume do leite (SÁNCHEZ, et al. 2011). Sua utilização e/ou eliminação é uma das principais preocupações para os especialistas em leite de todo o mundo por conter componentes valiosos que não devem ser desperdiçados e por representar um importante poluente ambiental (EL-SALAM, et al. 2009).

As soro proteínas lácteas são bem conhecidas por apresentarem alto valor biológico e propriedades funcionais versáteis, características que fazem com que sejam amplamente utilizadas na indústria de alimentos (JARA; PILOSOF, 2011) e farmacêutica (MARQUES, et al. 2005). Físico-quimicamente, são proteínas compactas e globulares, responsáveis por 20% do total de proteínas contidas no leite e, ao contrário das caseínas, permanecem solúveis em pH 4,6 (ASGHAR, et al. 2011). As principais proteínas presentes no soro do leite são β -lactoglobulina (3,2 g/L, 18,3 kDa), α -lactoalbumina (1,2 g/L, 14,2 kDa), soro albumina (0,4 g/L, 66 kDa), imunoglobulinas (0,8 g/L, 146 a 1.030 kDa), lactoferrina (0,2 g/L, 80 kDa) entre outras (LIVNEY, 2010; FOUCQUIER, et al. 2012).

Proteínas do soro do leite bovino têm sido extensivamente estudadas. No entanto, faltam maiores informações sobre as proteínas do soro do leite bubalino (BUFFONI, et al., 2011). Informações sobre peptídeos bioativos de proteínas do soro do leite bubalino não estão disponíveis ainda, indicando que mais pesquisas são necessárias a fim de se explorar plenamente essas proteínas com essa finalidade (EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2011).

Tecnologias atuais permitem a separação, isolamento e purificação das proteínas do soro do leite, e normalmente envolvem a combinação de métodos, como técnicas de filtração associados a métodos cromatográficos (JARA; PILOSOF, 2011), disponibilizando no mercado uma grande variedade de produtos como concentrados (35-80% de proteínas) e isolados proteicos (teor mínimo de proteínas de 90%), frações proteicas (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina) e hidrolisados proteicos (EL-SALAM et al. 2009).

A hidrólise enzimática de macromoléculas em alimentos como as proteínas, tornou-se um processo de considerável importância que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas (PACHECO et al, 2005).

Hidrolisados proteicos do soro do leite são uma boa fonte de peptídeos bioativos (LEKSRIOMPONG, et al. 2010) com atividade opióide, antihipertensiva, antitrombótica, imunomodulatória e antimicrobiana (NAGPAL, et al. 2011), e fonte de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004), que têm sido frequentemente utilizados como suplementação proteica para lactentes, esportistas e administração parenteral (RUTHERFURD, 2010).

O objetivo deste trabalho foi produzir hidrolisados proteicos com médio e alto grau de hidrólise a partir do soro do leite bubalino. Um objetivo adicional foi verificar *in vitro* os produtos de hidrólise dialisáveis obtidos pela ação das enzimas digestivas pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A antes e após a dialisabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Soro do leite bubalino foi produzido no laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, segundo metodologia descrita por Custódio et al. (2005). O leite de búfala integral pasteurizado foi gentilmente cedido pelo Laticínio Búfalo Dourado localizado no município de Dourado, Rodovia SP-215, Km 200.

No processo de hidrólise foram utilizadas as enzimas proteolíticas pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A (Sigma ®).

Métodos

Obtenção do soro doce do leite bubalino

O soro de leite bubalino foi obtido a partir de leite integral de búfala com a adição da enzima renina de *Aspergillus niger* (Estrela®). Para cada litro de leite foi utilizada a proporção de 0,6% v/v de renina e CaCl_2 (0,5 mol/L, 0,5%). A mistura foi mantida em banho-maria sem agitação durante uma hora a 35°C. Decorrido o tempo de coagulação, os sólidos foram separados através de filtração simples com gaze (CUSTÓDIO, 2005). O soro produzido foi dialisado por 24 horas em membrana celulósica Trip-Fort (Hoechst) em constante agitação contra água destilada sob refrigeração para a remoção de lactose. No intervalo de 24 hs foram realizadas três trocas de água (McPHIE, 1971). Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim, na proporção de 0,6 g/30 mL de soro para adsorção da gordura. O soro foi centrifugado em centrífuga refrigerada para separação do caulim. O soro dialisado, desengordurado e centrifugado foi armazenado em frascos identificados, e congelados até o momento dos ensaios.

O leite bubalino utilizado foi obtido de diferentes épocas, ou seja, primeiro e segundo semestre do ano de 2010 e o soro produzido em ambos os lotes foram misturados para a realização dos ensaios.

Hidrólise Enzimática

A metodologia utilizada para a hidrólise enzimática do soro de leite tratado (dialisado, desengordurado e centrifugado) foi a mesma descrita por Custódio (2001) e Marques (2005 e 2009). Para o médio e alto grau de hidrólise foram empregadas as proteases pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase-A. Alíquotas foram retiradas de tempos em tempos e analisadas em SDS-PAGE e CLAE para o acompanhamento do grau de hidrólise. As hidrólises foram conduzidas conforme o fluxograma abaixo (Figura 1):

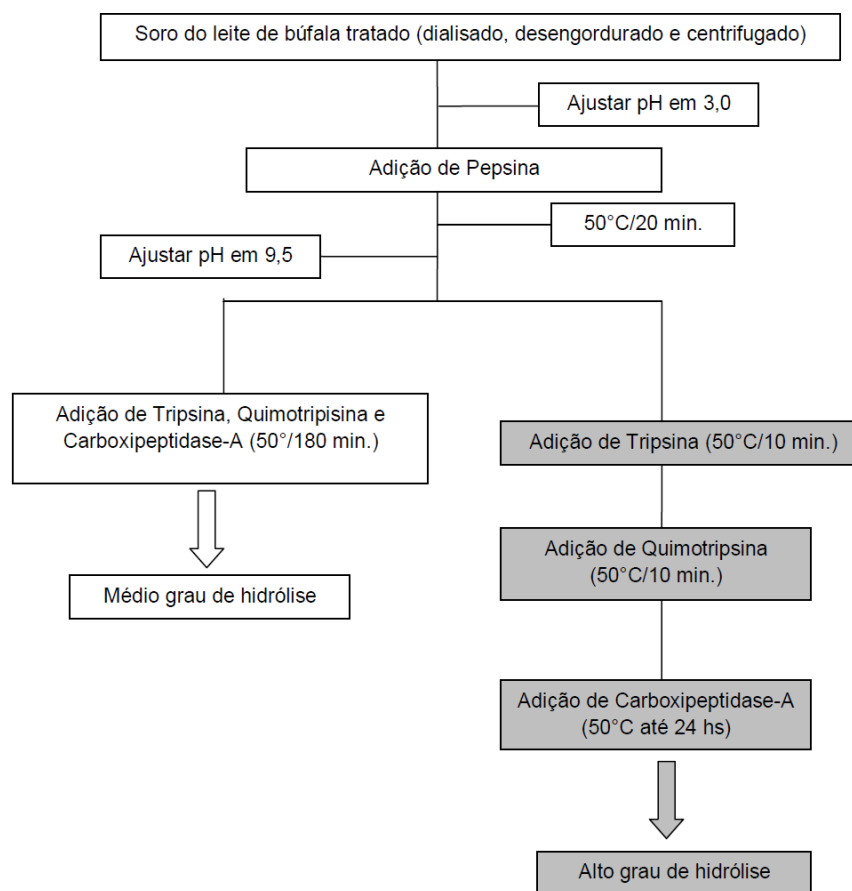


Figura 1. Fluxograma de médio e alto grau de hidrólise das proteínas presentes no soro do leite de búfala.

Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal pelo método da dialisabilidade dos soros do leite bubalino não hidrolisado (NH), médio grau de hidrólise (MGH) e alto grau de hidrólise (AGH)

Para a determinação da porcentagem de proteínas e de suas frações dialisáveis, foi utilizado o método de Miller et al. (1981) modificado por Luten et al. (1996), que envolve a simulação da digestão gastrointestinal (gástrica e duodenal). Em linhas gerais, 95 mL dos soros NH, MGH e AGH foram submetidos à digestão gástrica com 3mL de pepsina (0,16g/mL de HCl 0,1M), após acidificação do soro com HCl 6N até pH 2. A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por duas horas e logo em seguida foi para banho de gelo por 10 minutos para minimizar a ação da pepsina. Duas alíquotas foram retiradas para determinação da acidez titulável com NaOH 0,5M até pH 7,5 para o cálculo do número de equivalentes de NaHCO_3

0,5M necessários para simular o pH intestinal, e três alíquotas foram submetidas à digestão intestinal.

Para digestão intestinal membranas com poros que permitem a diálise de moléculas com MM até 12,4 kDa (Sigma®), devidamente preenchidas com NaHCO₃ 0,5M, foram acomodadas em béqueres de 250 mL com 20 mL de digerido gástrico, de modo que tivessem o máximo de contato com o digerido. Os béqueres foram mantidos em banho-maria a 37°C até que o meio externo estivesse com um pH próximo de 5,0, respeitando um tempo de espera de no máximo 90 minutos.

Com o pH próximo a 5,0, foram adicionados em cada um dos três béqueres, 5 mL de solução bile-pancreática (20mg de pancreatina + 125mg de extrato biliar em 5mL de NaHCO₃ 0,1 M - Sigma®) e mantidos em banho-maria durante duas horas a 37°C.

Após a digestão, o líquido interno das membranas de diálise foi recolhido em frascos, e mantido em freezer até o momento das dosagens de aminoácidos. Amostras foram analisadas por CLAE para caracterização de seu conteúdo. Para tanto as amostras foram previamente filtradas em unidade filtrante GV Millex 0,45 µm da Millipore antes de ser injetado no aparelho.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método de funcionalização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA) em analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra.

A relação molar dos aminoácidos foi estabelecida, considerando-se unitária a concentração do aminoácido mais próximo da média para todos os resíduos.

Dosagem de proteína total, lactose e gordura

As dosagens de proteínas, lactose e gordura foram realizadas de acordo com os métodos de Bradford (1976), Miller (1959) e de Gerber (Adolfo Lutz, 2005) respectivamente. A proteína soro albumina bovina (BSA) foi utilizada para obtenção da curva padrão de proteínas.

Análise do perfil proteico das proteínas do soro do leite bubalino por PAGE e SDS-PAGE

As proteínas do soro do leite bubalino foram caracterizadas por PAGE (10%), segundo o método de Davis (1964) e por SDS-PAGE (12%) com base no método Laemmli (1970), utilizando como padrão de massa molar o kit GE Lifesciences® composto por fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

Para PAGE, cada amostra foi diluída no corante azul de bromofenol (1:1) e a coloração do gel foi realizada com prata de acordo com o método de Blum et al. (1987) e para SDS-PAGE, as amostras foram diluídas em tampão de ruptura (1:1) e a coloração do gel foi realizada com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®).

Análise dos hidrolisados de médio e alto grau de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência

A hidrólise enzimática foi acompanhada em diversos tempos no intervalo de 180 minutos para médio grau de hidrólise e de 24 horas para alto grau de hidrólise.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala analítica, foi efetuada em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Kromasil (250 x 4,6 mm), $\Phi = 5\mu\text{m}$, 300Å de porosidade, com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem de proteínas, lactose e gordura em soro doce do leite bubalino em diferentes condições

A caracterização dos teores médios de proteínas, lactose e gordura do soro do leite bubalino é importante uma vez que confirmam dados da literatura quanto sua riqueza em relação ao soro lácteo bovino como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Concentração de proteínas, lactose e gordura do soro do leite bubalino *in natura* e tratado.

Condições	Proteínas (g/L)	Lactose (g/L)	Gordura (%)
Soro integral <i>in natura</i>	11,13 ±0,13	65,30 ±2,20	0,90 ±0,17
Soro dialisado*	7,33 ±0,15	1,23 ±0,14	0,60 ±0,10
Soro tratado**	6,53 ±0,49	1,00 ±0,14	< 0,10
Soro bubalino integral (Lira, et al. 2009)	11,90	58,50	1,20
Soro bovino (Romám, et al. 2011)	5,40	42,60	2,00

*redução do teor de lactose; **dialisado, desengordurado e centrifugado.

Observa-se que a concentração de proteína foi diretamente afetada pelo processo de diálise que pode estar relacionado a presença de peptídeos e resíduos de aminoácidos oriundos do processo de coagulação enzimática do leite para a obtenção do soro superestimando o valor real. Com relação à literatura, o soro do leite bubalino integral apresentou valores para proteínas, lactose e gordura muito próximos ao estudo realizado por Lira et al. (2009), que também utilizou o soro bubalino. Comparado ao trabalho de Romám et al. (2009), que utilizou soro do leite bovino, os teores foram inferiores aos encontrados para o soro do leite de búfala, tendo como exceção a porcentagem de gordura. Cabe ressaltar que, além dos relacionadas a diferentes espécies de mamíferos, fatores genéticos e ambientais conforme já descrito pela literatura.

Caracterização do perfil protéico do soro do leite bubalino comparado com o soro do leite bovino por PAGE e SDS-PAGE

O perfil protéico do soro do leite bubalino mostrado por PAGE (figura 2) demonstra uma ligeira diferença na migração das bandas proteicas equivalentes a soro albumina (SA) e α -lactoalbumina (α -La), quando comparado ao perfil protéico do soro do leite bovino. É possível verificar também a presença de uma banda protéica adicional no soro do leite bubalino na região entre as frações α -La e β -Lg. Na literatura há falta de dados sobre o perfil protéico do soro do leite da espécie bubalina, mas em um estudo recente realizado por Bufonni et al. (2011), através do método cromatográfico RP-HPLC, foi determinado a presença de dois picos protéicos correspondentes a α -La. Em outro trabalho realizado Chianese et al. (2004) como soro do leite bubalino foi verificado através da técnica da focalização isoeletrica que a α -La possui duas variantes genéticas, α -La A e α -La B.

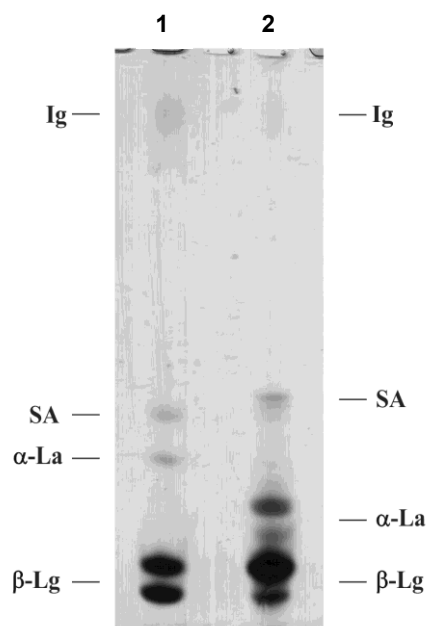


Figura 2: Perfil proteico do soro de leite bovino tratado (1) e bubalino tratado (2) por PAGE – 10% corado com prata segundo o método de Blum et al. (1987). Ig: imunoglobulina; SA: soro albumina; α -La: alfa-lactolalbumina; β -Lg:lactoglobulina

No intuito de se esclarecer essas diferenças protéicas entre o soro bubalino e bovino realizou-se uma SDS-PAGE (12%) e através dos resultados obtidos ficou confirmada a presença de uma fração protéica no soro bubalino que não está presente no soro bovino e apresenta massa molar situada entre 20,1 e 30,0 kDa e uma mobilidade eletroforética relativa (Rf) de 0,73 (Figura 3). Quanto às demais proteínas, o soro do leite de búfala é muito semelhante ao soro do leite bovino, ou seja, proteínas com massas molares entre 97 e 66 kDa (imunoglobulinas e soroalbumina) e entre 20,1 e 14,4 kDa (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Há também uma proteína massa molar de aproximadamente 30 kDa presente nas duas espécies, mas que no soro bovino está mais evidente.

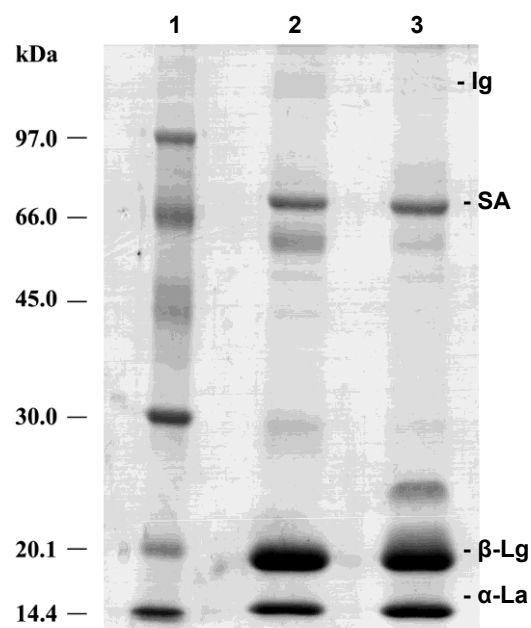


Figura 3: SDS-PAGE – 12% comparando as proteínas do soro do leite bovino e bubalino corado com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). (1) Padrão de massa molecular; (2) soro de leite bovino; (3) soro de leite bubalino. Ig: imunoglobulina; SA: soro albumina; α -La: alfa-lactolalbumina; β -Lg: lactoglobulina

Caracterização do soro lácteo bubalino com MGH e AGH por SDS-PAGE e CLAE

Os resultados obtidos por SDS-PAGE para os hidrolisados com MGH e AGH (figuras 4 e 5), demonstraram que em ambas as condições a proteína soro albumina foi rapidamente hidrolisada, ou seja, após 20 minutos de hidrólise e sob a ação exclusiva da enzima pepsina (raia 5). Também foi possível verificar que a fração protéica que está presente no soro do leite bubalino (raia 3) e que não se encontra no soro do leite bovino (raia 2), desapareceu por completo (raia 4) uma hipótese é a sua precipitação pela acidificação até pH 3,0, há também a possibilidade de ter ocorrido a hidrólise imediata pela ação da pepsina. Na hidrólise com MGH (figura 4), mesmo após 180 minutos sob a ação das enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A foi possível verificar a presença de três frações protéicas resistentes à hidrólise, sendo duas delas a α -La e β -Lg (12). No entanto, a diminuição na intensidade de cor das frações protéicas ao longo do tempo demonstram a ação catalítica gradual das proteases utilizadas. Para o soro com AGH (figura 5), onde as enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A foram adicionadas respeitando um intervalo de 10 minutos de ação entre elas, com 180 minutos de hidrólise (raia 12) já foi possível verificar uma hidrólise mais

efetiva em relação à hidrólise parcial, de modo que após 24 horas (raia 16) ainda foi possível verificar a presença da α -La; no entanto, β -Lg foi totalmente hidrolisada.

Os resultados obtidos por CLAE para hidrólise com MGH e AGH corroboram com os dados obtidos por SDS-PAGE através da análise dos últimos tempos de hidrólise de cada condição, 180 minutos e 24 horas, respectivamente. As figuras 6, 7 e 8 correspondem aos cromatogramas que demonstram a evolução do grau de hidrólise em cada condição.

O cromatograma do soro não hidrolisado - NH (figura 6) apresentou poucos picos, havendo predomínio nos tempos de retenção entre 17,0 e 17,8 minutos. Esse número reduzido de picos já era esperado, já que as proteínas presentes no soro do leite bubalino apresentavam-se íntegras em relação à sua cadeia polipeptídica. Ao se analisar a figura 7, após 180 minutos de hidrólise (MGH), observa-se um aumento considerável no número de picos que indica a liberação de vários peptídeos e que grande parte das proteínas já foram hidrolisadas. Além disso, os picos que apareceram nesta com mais evidência foram também hidrolisados conforme mostrado na figura 8, que mostra o perfil cromatográfico do soro do leite bubalino após 24 horas de hidrólise (AGH), onde nota-se a redução do número de picos em relação ao encontrado para o soro PH (figura 7). Essa redução é atribuída à ação das proteases que foram capazes de hidrolisar parte dos peptídeos que ainda não haviam sido hidrolisados no soro com MGH, o que leva à formação de aminoácidos não detectados por UV.

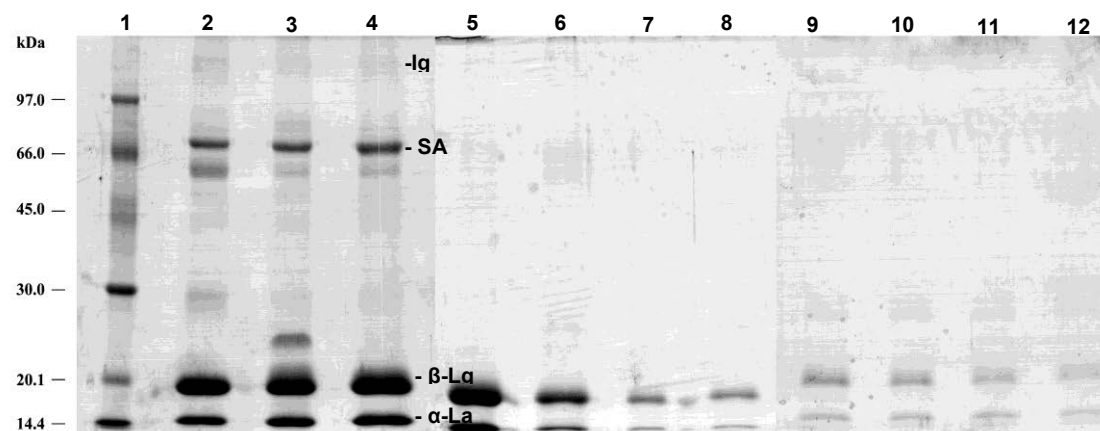


Figura 4: SDS-PAGE – 12% dos produtos de hidrólise com MGH do soro do leite bubalino corado com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). 1) padrão de massa molar (5 µL); 2) soro do leite bovino tratado (10 µL); 3) soro do leite bubalino tratado (10 µL); 4) tempo zero – 20 µL (pepsina 0,5mg/mL; pH 3,0; 50°C); 5) 20 min. – 20 µL (condição do tempo zero seguido de fervura por 3 min. e mudança para pH 9,5 e adição das enzimas tripsina 0,5mg/mL, quimotripsina 0,5mg/mL e carboxipeptidase A 0,005mg/mL); 6) 40 min. – 20 µL; 7) 60 min. – 20 µL; 8) 80 min. – 20 µL; 9) 100 min. – 20 µL; 10) 120 min. – 20 µL; 11) 150 min. – 20 µL; 12) 180 min. – 20 µL (tempos F, G, H, I, J, K e L pH 9,5; 50°C e enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A). Ig: imunoglobulina; SA: soro albumina; α -La: alfa-lactolabumina; β -Lg:lactoglobulina.

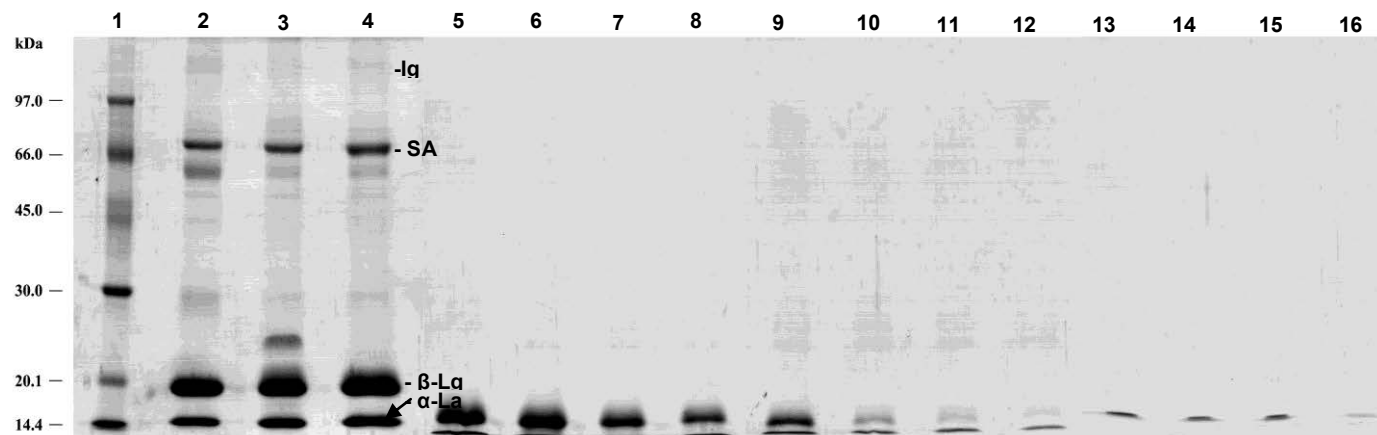


Figura 5: SDS-PAGE – 12% dos produtos de hidrólise com AGH do soro do leite bubalino corado com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). 1) padrão de massa molecular (5 μ L); 2) soro do leite bovino tratado (10 μ L); 3) soro do leite bubalino tratado (10 μ L); 4) tempo zero – 20 μ L (pepsina 0,5mg/mL; pH 3,0; 50°C); 5) 20 min. – 20 μ L (condição do tempo zero seguido de fervura por 3 min. e mudança para pH 9,5); 6) 30 min. – 20 μ L (tripsina 0,5mg/mL); 7) 40 min. – 20 μ L (quimotripsina 0,5mg/mL); 8) 50 min. – 20 μ L (carboxipeptidase A 0,005mg/mL); 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 – 20 μ L (60, 120, 150, 180, 240, 300, 360 e 1440 min., 50°C). Ig: imunoglobulina; SA: soro albumina; α -La: alfa-lactolabumina; β -Lg:lactoglobulina.

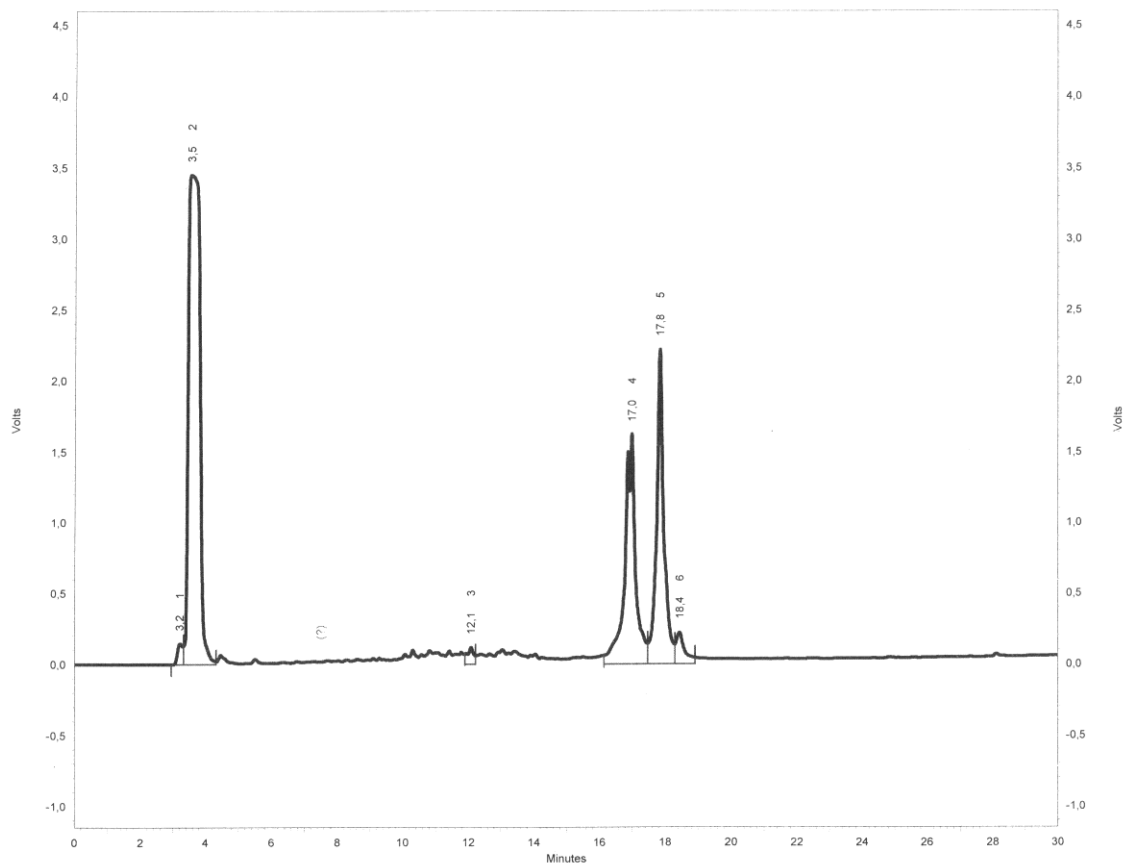


Figura 6: Cromatograma do soro do leite bubalino não hidrolisado (NH). Coluna de fase reversa C₁₈ Kromasil (250 x 4,6 mm), $\Phi = 5\mu\text{m}$, 300Å de porosidade com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

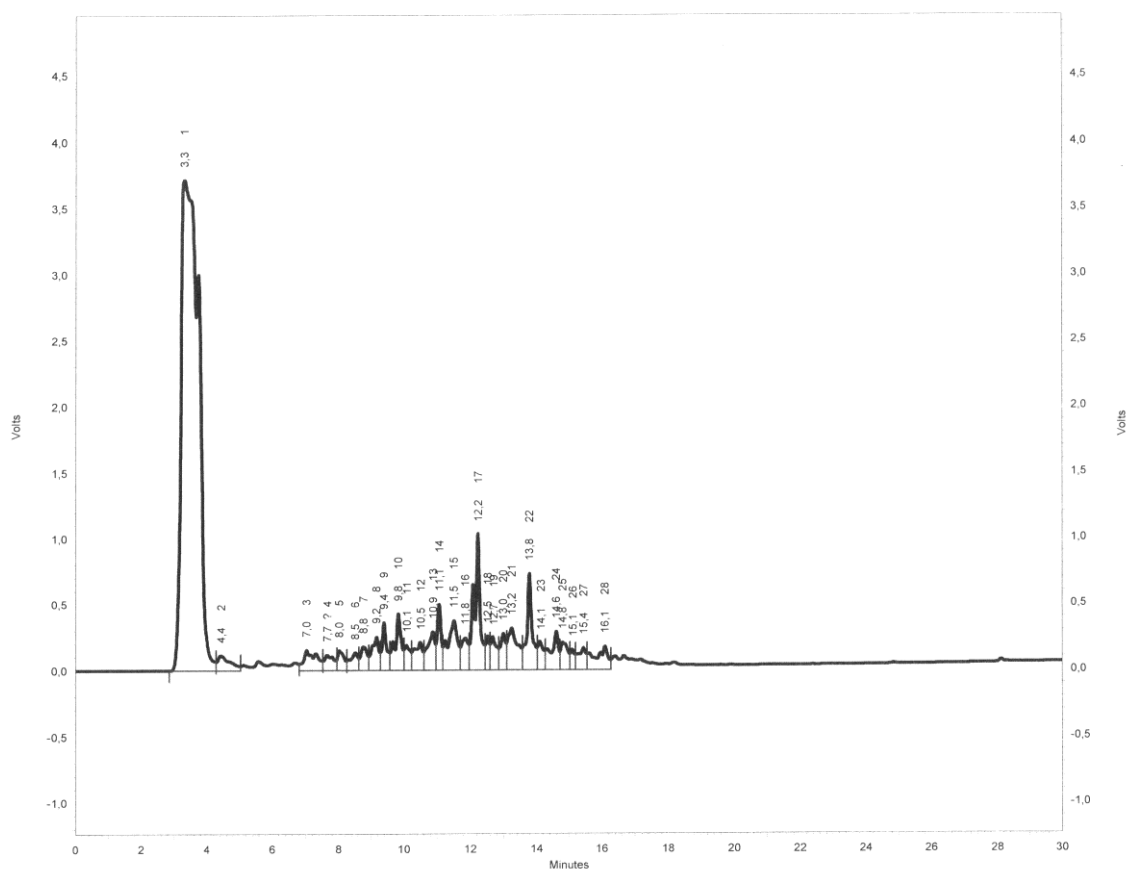


Figura 7: Cromatograma do soro do leite bubalino com médio grau de hidrólise (MGH). Coluna de fase reversa C₁₈ Kromasil (250 x 4,6 mm), $\Phi = 5\mu\text{m}$, 300Å de porosidade com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

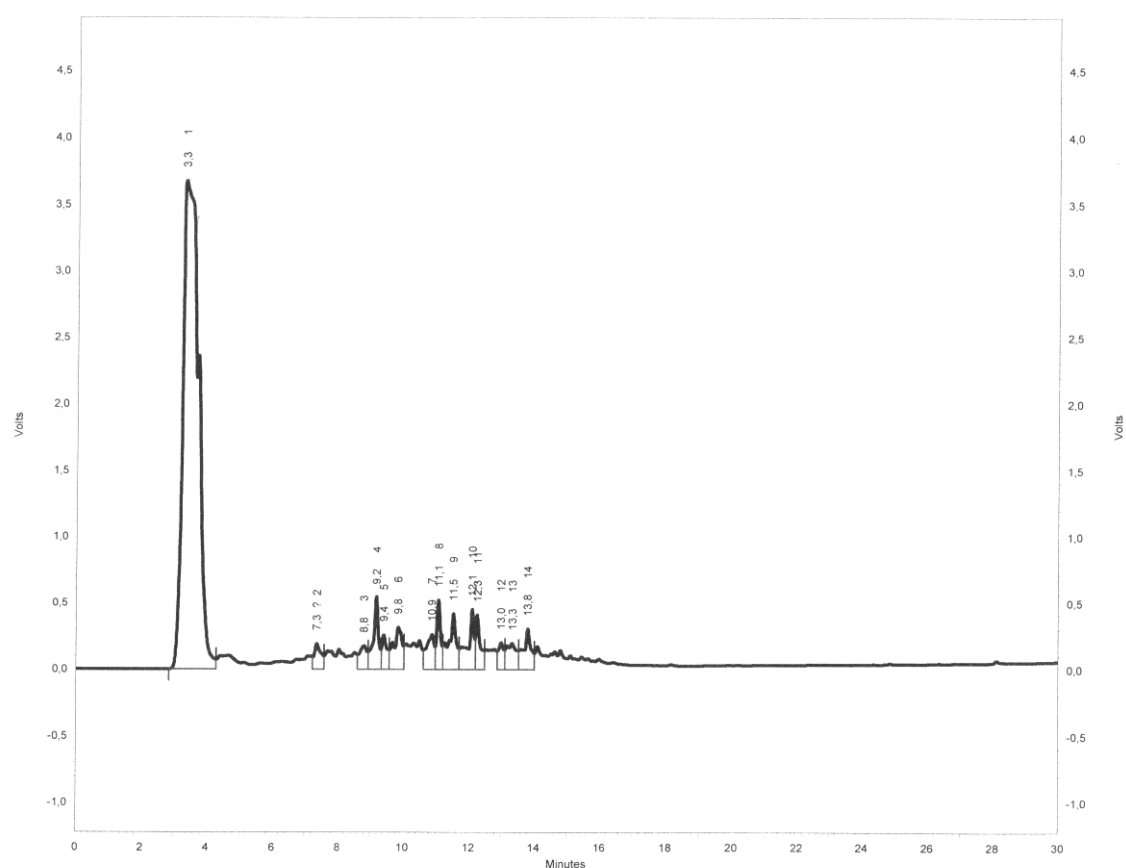


Figura 8: Cromatograma do soro do leite bubalino com alto grau de hidrólise (AGH).

Coluna de fase reversa C₁₈ Kromasil (250 x 4,6 mm), $\Phi = 5\mu\text{m}$, 300Å de porosidade com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

Obtenção de aminoácidos do soro do leite bubalino não hidrolisado e com médio e alto grau de hidrólise antes e após o método da dialisabilidade.

Através dos resultados obtidos com os aminogramas, cujas concentrações de aminoácidos estão discriminadas na tabela 2, foi possível verificar que a hidrólise das proteínas do soro do leite bubalino liberou aminoácidos indispensáveis para o funcionamento de nosso organismo, principalmente no que diz respeito à síntese de novas proteínas.

A primeira hidrólise com as proteases pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A adicionadas em conjunto (MGH) e separadamente (AGH) promoveram a liberação de uma menor variedade de aminoácidos em relação aos resultados obtidos para os soros NH, MGH e AGH que foram submetidos à dialisabilidade. Na hidrólise com as quatro proteases foram liberados cerca da metade dos vinte aminoácidos, ou seja, nove aminoácidos para o soro com MGH. Destes, quatro essenciais (leucina, fenilalanina, histidina e lisina) e 10 aminoácidos para o soro TH, onde cinco são essenciais (leucina, isoleucina, fenilalanina, histidina e lisina) conforme demonstrado na tabela 2. No entanto, essa menor variedade de aminoácidos para a primeira hidrólise não chega a ser uma desvantagem, pois como podemos observar nos cromatogramas das figuras 7 e 8, há a presença de possíveis peptídeos que, com estudos adicionais, podem vir a apresentar alguma propriedade bioativa. Outra diferença que se pode observar é a maior concentração do aminoácido prolina nos soros com MGH e AGH da primeira hidrólise em relação ao resultado obtido com a dialisabilidade.

Tabela 2: Perfil aminoacídico do soro do leite bubalino NH, com MGH e AGH, antes e após dialisabilidade.

Aminoácido (nM)	Hidrólise 1*			Dialisabilidade											
	NH	MGH	AGH	NH-DG	NH-DIext	NH-DIint	Σ AA**	MGH-DG	MGH-DIext	MGH-Diint	Σ AA**	AGH-DG	AGH-DIext	AGH-Diint	Σ AA**
Asp		25,692	42,094	41,356	156,505	36,537	193,042	451,747	199,156	111,345	310,501	514,48	138,848	96,877	235,725
Thr				50,561		389,537	389,537	386,135	1298,012	423,932	1721,944	426,081	1134,739	398,165	1532,904
Ser				24,198				222,233				212,067			
Glu				77,682	260,957	73,925	334,882	623,413	597,372	237,544	834,916	691,035	487,047	251,237	738,284
Pro		1751,295	2306,616		21,802		21,802	55,303	49,514			152,67	31,927		
Gly		65,19	87,162	31,687	164,689	37,076	201,765	299,986	164,738	119,37	284,108	350,02	165,579	120,686	286,265
Ala				40,558	1.172,12	133,314	1305,435	474,57	626,602	229,531	856,133	531,357	579,769	243,989	823,758
Cys					333,82		333,82								
Val				32,91	1128,851	240,016	1368,867	228,764	685,277	216,818	902,095	248,826	534,503	191,458	725,961
Met		94,972	107,605	151,603	431,575	110,527	542,102	240,577	187,565	68,692	256,257	273,693	151,407	75,154	226,561
Ile			201,231						330,304						
Leu		792,58	783,473	221,215		1270,93	1270,93	1242,176	1486,901	1141,124	2628,025	1295,509	1822,587	1050,825	2873,412
Tyr				229,201	541,631	388,603	930,234	669,422	733,201	482,645	1215,846	624,271	738,28	485,299	1223,579
Phe		319,426	325,491	326,258	586,791	456,192	1042,983	538,699	659,497	462,148	1121,645	674,24	648,039	484,046	1132,085
His		184,623	604,147	592,122	486,849	225,905	712,754	1081,911	302,686	60,797	363,483	1170,781	236,211	309,935	546,146
Lys		392,204	368,867	103,645	1355,253	834,458	2189,711	237,9	1168,512	693,039	1861,551	301,897	1212,762	725,096	1937,858
Arg		10,634	6,793	15,681	421,154	251,463	672,617	41,826	514,483	301,067	815,55	54,35	504,479	302,606	807,085
Total		3636,616	4833,479	1938,677	7061,998	4448,483	11510,48	6794,662	9003,82	4548,052	10544,03	7521,277	8386,177	4735,373	13089,62

* hidrólise com as proteases pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A; ** total de aminoácidos liberados pela dialisabilidade (DIext + DIint).

NH = não hidrolisado; MGH = médio grau de hidrólise; AGH = alto grau de hidrólise; NH-DG = não hidrolisado digerido gástrico; NH-DIext = não hidrolisado digerido intestinal externo; NH-DIint = não hidrolisado digerido intestinal interno; MGH-DG = médio grau de hidrólise digerido gástrico; MGH –DIext = médio grau de hidrólise digerido intestinal externo; MGH –DIint = médio grau de hidrólise digerido intestinal interno; AGH –DG = alto grau de hidrólise digerido gástrico; AGH –DIext = alto grau de hidrólise digerido intestinal externo; AGH – DIint = alto grau de hidrólise digerido intestinal interno.

De modo geral, a digestão *in vitro* do soro do leite bubalino tratado e não hidrolisado foi capaz de promover a liberação de dezessete dos vinte aminoácidos existentes. Do total de aminoácidos liberados, setes deles são aminoácidos essenciais, dos quais as maiores concentrações foram dos resíduos de valina, leucina e lisina. No entanto, a absorção do aminoácido valina foi de apenas 17,53%, diferente da leucina que foi absorvida totalmente e a lisina com uma taxa de absorção de 38,11%. Resíduos de isoleucina, triptofano, asparagina e glutamina não foram detectados em nenhuma das etapas da digestão, enquanto que a treonina foi absorvida totalmente. Outros aminoácidos também apresentaram taxas de absorção significativas, ou seja, fenilalanina, tirosina e arginina apresentaram taxas de absorção de 43,74%, 41,77% e 37,39%, respectivamente. Com os demais aminoácidos as taxas de absorção ficaram abaixo de 32%. Com isso foi possível verificar que as condições produzidas pela dialisabilidade são mais eficientes quando o objetivo é a produção de aminoácidos livres e que o soro do leite bubalino pode vir a ser uma importante fonte de aminoácidos essenciais. Cabe ressaltar, que a detecção dos aminoácidos pelo método empregado dependem diretamente de sua carga líquida que sofrem alterações com as condições do ensaio devido as diferentes faixas de pH empregadas.

Os soros com MGH e AGH, após passarem pela segunda hidrólise, ou seja, que foram submetidos à dialisabilidade, liberaram uma maior variedade e concentração de aminoácidos livres, fato já esperado uma vez que o soro lácteo bubalino já havia passado por uma primeira hidrólise onde foi possível verificar a presença de muitos peptídeos que foram mais facilmente hidrolisados pela pepsina e uma mistura de pancreatina e sais biliares durante a simulação da digestão gastrointestinal.

Dos vinte aminoácidos que estão diretamente envolvidos com as funções corpóreas, 13 foram liberados após a dialisabilidade para ambos os soros com MGH e AGH; destes, 8 são essenciais para mamíferos incluindo seres humanos, ou seja, que não são sintetizados pelo organismo e devem ser ingeridos com a dieta, sendo que asparagina, glutamina e triptofano não foram detectados em nenhum dos tratamentos. Entre os essenciais, a leucina foi liberada em maior concentração nos soros com MGH e AGH e suas absorções foram de 43,42% e 36,57%, respectivamente.

A leucina está envolvida em processos importantes como a síntese e degradação de proteínas musculares e também no estímulo à liberação de insulina pelo pâncreas, de modo que já vem sendo visto como um farmaconutriente de grande relevância para suplementação

alimentar de idosos frágeis e desnutridos, como também para subpopulações específicas. No caso de idosos, poderia atuar minimizando a sarcopenia, principalmente em pacientes com diabetes tipo 2, pois além de possuir propriedades insulínótropicas pode vir a ajudar na síntese protéica muscular, uma vez que em diabéticos há um declínio acelerado de massa muscular (LEENDERS e LOON, 2011; TESSARI, et al, 2011).

Outros aminoácidos como a lisina, treonina, tirosina, fenilalanina também foram liberados em maiores concentrações na segunda hidrólise dos soros com MGH e AGH, e a porcentagem de absorção em ambos os casos foi de aproximadamente 38% para a lisina, 25% para a treonina, 40% para a tirosina e 42% para a fenilalanina, demonstrando que uma maior liberação não está diretamente relacionada a uma maior absorção. No entanto, a dialisabilidade é um método *in vitro* que nos dá apenas um resultado preliminar, necessitando de maiores confirmações com estudos *in vivo*.

Os demais aminoácidos liberados, mesmo em menores concentrações e com porcentagens menores de absorção, estão envolvidos em muitos processos reguladores como expressão gênica, onde estudos *in vitro* indicam que a suplementação dietética com glutamina e arginina aumentaram a expressão de genes com propriedades antioxidantes e reduzindo a expressão de genes pró-inflamatórios. Outra função reguladora atribuída aos aminoácidos é a síntese e secreção de hormônios, como a tirosina e fenilalanina que são precursores para a síntese de epinefrina, norepinefrina, dopamina e hormônios da tireóide (WU, 2009). Também há a função imunológica já bem estabelecida e relacionada aos aminoácidos glutamina, arginina, metionina e cisteína, entre outras funções (LI, et al., 2007; WU, 2009).

CONCLUSÕES

O perfil protéico do soro do leite de búfala é muito semelhante ao do soro bovino. A principal diferença encontrada foi à presença de uma provável variante genética da β -lactoglobulina, que não está presente no soro bovino. No entanto, maiores estudos devem ser realizados para comprovar essa hipótese. A concentração de proteína, apesar de sofrer influência de fatores como estação do ano, dieta animal e período de lactação, apresentou um valor bastante significativo que faz do soro dessa espécie uma fonte viável para obtenção de proteínas de alto valor biológico. Além disso, possui um potencial amplo para o desenvolvimento de estudos em diversas áreas do conhecimento, ou seja, química, tecnológica e nutricional.

Em relação ao processo de hidrólise, o método empregado foi capaz de hidrolisar quase que totalmente as proteínas do soro do leite bubalino, de forma que os produtos obtidos serão melhores estudados, buscando atingir um universo mais amplo como a aplicação desses nutrientes com fins alimentícios, um dos objetivos do profissional envolvido com área de ciência dos alimentos.

A simulação da digestão gastrointestinal através do método da dialisabilidade mostrou-se mais eficiente quanto à liberação e variedade de aminoácidos para o soro não hidrolisado e também promoveu um aumento na concentração de aminoácidos para os soros que já haviam passado pela primeira hidrólise.

O soro do leite bubalino mostrou ser uma fonte alternativa de aminoácidos essenciais, enquadrando suas proteínas na categoria de proteínas de alto valor biológico, Além disso, esses aminoácidos estão biodisponíveis para desempenharem suas respectivas funções fisiológicas.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKNAVAN, T.; LUHOVYY, B.L.; BROWN, P.H.; CHO, C.E.; ANDERSON, G.H. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.966-975, 2010.

ASGHAR, A.; ANJUM, F.M.; ALLEN, J.C. Utilization of dairy byproduct proteins, surfactants and enzymes in frozen dough. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.374-382, 2011.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

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, p.248-254, 1976.

BUFFONI, J.N.; BONIZZI, I.; PAUCIULLO, A.; RAMUNO, L.; FELIGINI, M. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Food Chemistry**, v.127, p. 1515 – 1520, 2011.

CHIANESE, L.; CAIRA, S.; LILLA, S.; PIZZOLONGO, F.; FERRANTI, P.; PUGLIANO, G.; ADDEO, F. Primary structure of water buffalo α -lactalbumin variants A and B. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.14-19, 2004.

CUSTÓDIO, M.F. **Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite: caracterização cinética e condições ótimas de pH e temperatura**. 2001. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; MARQUES, D.P.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C; MONTI, R. Hydrolysis of cheese whey proteins with trypsin, Chymotrypsin and carboxypeptidase A. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.16, n.2, p.105-109, 2005.

DAVIS, B.J. Disk electrophoresis: Method and application to human serum proteins. **Annals of New York Academic Science**, v.121, p.404-427, 1964.

EL-SALAM, M.H.A.; EL-SHIBINY, S.; SALEM, A. Factors affecting the functional properties of whey protein products: a review. **Food Reviews International**, v.25, p.251-270, 2009.

EL-SALAM, M.H.A; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science and Technology**, v.91, p.663-699, 2011.

FOUCQUIER, J.; CHANTOISEAU, E.; LE FEUNTEUN, S.; FLICK, D.; GAUCEL, S.; PERROT, N. Toward an integrated modeling of the dairy product transformations, a review of the existing mathematical models. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.1-13, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 4. ed. São Paulo: IMESP, 2005, p.840-841.

JARA, F.; PILOSOFF, A.M.R; Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.374-380, 2011.

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

LEENDERS, K.; LOON, L.J.C.V. Leucine as a pharmaconutrient to prevent and treat sarcopenia and type 2 diabetes. **Nutrition Reviews**, v.69, n.11, p.675-689, 2011.

LEKSRISOMPONG, P.P.; MIRACLE, R.E.; DRAKE, M . Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.58, n.10, p. 6318-6327, 2010.

LI, P.; YIN, Y.L.; LI, D.; KIM, S.W.; WU, G. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.237-252, 2007

LIRA, H. L.; SILVA, M.C.D.; VASCONCELOS, M.R.S.; LIRA, E.L.; LOPEZ, A.M.Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 33-37, jan.-mar. 2009.

LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.15, p.73-83, 2010.

LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; DAEL, P.V.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L.H.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FRØHLICH, W. Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.72, n.4, p.415-424, 1996.

KHEDKAR, C.D.; KHEDKAR, G.D.; PATIL, M.R.; KALYANKAR, S.D. Buffalo Milk. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2 ed.)** p.705-709, 2003.

MARQUES, D. P.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; MONTI, R. Separação das proteínas do soro do leite por DEAE-TRISACRYL. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.17-20, 2005.

MARQUES, D.P. **Produção e aplicação de hidrolisado de proteínas do soro de queijo bovino no preparo de suplemento nutricional: minimização da sarcopenia em ratos idosos**. 2009, 125p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara.

MCPHIE, Peter. **Methods in Enzymology**, v.16, p. 23-32, 1971.

MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R.R.; VAN CAMPEN, D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p. 2248-2256, 1981.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

NAGPAL, R. et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. **Food and Function**, v.2, p.18-27, 2011.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 333-338, 2005.

ROMÁM, A.; WANG, J.; CSANÁDI, J.; HODÚR, C.; VATAI, G. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 702 – 709, 2011.

RUTHERFURD, S.M. Methodology for determination degree of hydrolysis of protein in hydrolysates: a review. **Journal AOAC International**, v.93, p.1515-1522, 2010.

SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J.M.; RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.103, p.147-155, 2011.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n. 4, p.397-409, 2004.

TESSARI, P.; CECCHET, D.; COSMA, A.; PURICELLI, L.; MILLIONI, R.; VEDOVATO, M.; TIENGO, A. Insulin resistance of amino acid and protein metabolism in type 2 diabetes. **Clinical Nutrition**, v.30, p.267-272, 2011.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions and nutrition. **Amino Acids**, v.37, p.1-17, 2009.