

Avaliação da atividade antimicrobiana de caseínas e do hidrolisado caseínico de leite caprino

Evaluation of the antimicrobial activity of caseins and casein hydrolysate from goat milk

DOI:10.34117/bjdv7n3-271

Recebimento dos originais: 12/02/2021

Aceitação para publicação: 12/03/2021

Thaís Susana Marinho Carneiro

Licenciada em Ciências Biológicas

Universidade Federal da Paraíba, Campus I - Lot. Cidade Universitaria, PB,
58051900

E-mail: thaissusana925@gmail.com

Paula Perazzo de Souza Barbosa

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba, Campus I - Lot. Cidade Universitaria, PB, 58051-900

E-mail: paulabio05@hotmail.com

Tatiane Santi Gadelha

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará; professora do Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I - Lot. Cidade Universitaria, PB, 58051-900

E-mail: santi.tatiane@gmail.com

RESUMO

Estima-se que cerca 80% das proteínas lácteas correspondem às caseínas, fosfoproteínas com radicais fosfatos ligados a resíduos de serina. Os peptídeos ocorrem naturalmente no leite caprino, e a concentração de caseínas por métodos de precipitação viabiliza a otimização do rendimento dos peptídeos, que podem ser produzidos por hidrólise enzimática *in vitro*, além de possibilitar a escolha do substrato, das enzimas específicas e das condições de reação. O mundo microbiano abrange uma miríade de microorganismos patogênicos, onde se destacam aqueles que causam doenças em humanos, como é o caso das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, que podem adquirir resistência devido ao uso indevido de antimicrobianos associada capacidade de mutação, o que torna conveniente a pesquisa contínua por novas opções de antimicrobianos. O leite caprino é fonte de uma variedade de proteínas bioativas que precisa ser sucessivamente explorada e que pode ser um aliado para ampliação da lista de substâncias passíveis de serem utilizadas no combate a bacterioses. Diante do exposto, o presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do precipitado de caseína e de peptídeos do leite caprino, obtidos por hidrólise enzimática *in vitro* frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. As proteínas nativas do precipitado de caseína do leite caprino na concentração de 3 mg/mL inibiu o crescimento bacteriano da cepa *E. coli*. No entanto, os peptídeos obtidos por meio da digestão com pepsina seguida de tripsina reduziu o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* na concentração de 1 mg/mL. Os dados deste estudo

indicam que é possível obter peptídeos antibacterianos de forma controlada por hidrólise enzimática do precipitado de caseína do leite caprino.

Palavras-Chaves: Peptídeos Bioativos, Hidrólise Enzimática, Pesina, Tripsina.

ABSTRACT

It is estimated that about 80% of milk proteins correspond to caseins, phosphoproteins with phosphate radicals attached to serine residues. Peptides occur naturally in goat milk, and the concentration of caseins by precipitation methods makes it possible to optimize the yield of peptides, which can be produced by enzymatic hydrolysis in vitro, as well as allowing the choice of substrate, specific enzymes, and reaction conditions. The microbial world encompasses a myriad of pathogenic microorganisms, especially those that cause diseases in humans, such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, which can acquire resistance due to misuse of antimicrobials associated with mutation capacity, which makes it convenient to continuously search for new antimicrobial options. Goat milk is a source of a variety of bioactive proteins that need to be successively explored and that can be an ally to expand the list of substances that can be used to combat bacterial diseases. The present work evaluated the antimicrobial activity of casein precipitates and goat milk peptides obtained by enzymatic hydrolysis in vitro against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The native proteins from goat milk casein precipitate at a concentration of 3 mg/mL inhibited the bacterial growth of *E. coli* strain. However, peptides obtained by digestion with pepsine followed by trypsin reduced the growth of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* at the concentration of 1 mg/mL. The data from this study indicate that it is possible to obtain antibacterial peptides in a controlled manner by enzymatic hydrolysis of goat milk casein precipitate.

Keywords: Bioactive Peptides, Enzymatic Hydrolysis, Pepsin, Trypsin

1 INTRODUÇÃO

A cabra (*Capra hircus*) é criada em várias partes do mundo e o seu leite é consumido pelo homem há milhares de anos (JOHANSSON et al., 2015). Evidências arqueológicas propõem que o animal surgiu a partir de duas espécies selvagens: *Capra aegagrus* (a cabra-selvagem) e *Capra falconeri* (o markhor), há cerca de 10.000 anos na região do Crescente Fértil (DONG et al., 2013), espalhando-se posteriormente pelo mundo e auxiliando no desenvolvimento das civilizações humanas (NOMURA et al., 2013).

A caprinocultura vem se estabelecendo no semiárido brasileiro, pois não necessita de altos investimentos ou grandes áreas para seu desenvolvimento. É um sistema de criação diferente que pode configurar em uma alternativa rentável (de OLIVEIRA; GOMES; BARBOSA, 2020) para pequenos e médios agricultores devido à fácil adaptação dos animais às condições da caatinga, o que tem feito, em especial,

da região Nordeste do Brasil uma das mais tradicionais a explorar a atividade leiteira, que tem ganhado espaço e contribuído com o seu desenvolvimento cultural, social e econômico (BATISTA; SOUZA, 2015).

Outro fator que deve impulsionar o investimento na caprinocultura leiteira é o alto valor biológico do leite caprino proporcionado por seus componentes, entre eles as proteínas (PEREIRA, 2005). Estima-se que cerca 80% das proteínas lácteas correspondam às caseínas (LIRA et al., 2010; BEZERRA, 2011), que são fosfoproteínas com radicais fosfatos ligados a resíduos de serina, em diferentes regiões da cadeia polipeptídica, o que gera o seu caráter anfifílico.

As evidências científicas de que fragmentos dos componentes da dieta também podem exercer diversas funções que vão além da função nutricional básica estão cada vez mais fortes (CHAKRABARTI et al. 2018). Os peptídeos, exemplos bem convencionados dessa ideia, já foram identificados naturalmente no leite caprino, mas também podem ser produzidos por hidrólise enzimática *in vitro*, e muitos já foram testados para diferentes bioatividade (AHMED et al., 2015; SGABIERIE, 2017).

A abordagem da hidrólise enzimática *in vitro* viabiliza a otimização do rendimento de peptídeos, possibilita a escolha do substrato, das enzimas específicas e das condições de reação (KUSUMANINGTYAS et al., 2015). O uso de enzimas proteolíticas na produção de peptídeos tem sido amplamente explorado em pesquisas com leite caprino, ovino, bubalino, equino e asinino (GUHA et al., 2021). Assim, os peptídeos são derivados de fontes de baixo custo e fácil obtenção, e podem ter potencial a ser aplicado em diferentes ramos como na medicina e na indústria de alimentos, entre outros que demandam de compostos com atividade antimicrobiana (WANG et al. 2020).

O mundo microbiano abrange uma miríade de organismos microscópicos, onde podem destacar-se aqueles que causam doenças em humanos. *P. aeruginosa* é um patógeno humano oportunista Gram-negativo altamente relacionadas às infecções nosocomiais (SHARMA et al. 2014). Possui capacidade de adaptabilidade, plasticidade fenotípica e genômica, ubiquidade e altamente oportunista (SHEN et al. 2006; SILBY et al. 2011; BROWN et al. 2012). *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva encontrada nas mucosas nasais, no trato respiratório e na pele (WENDLANDT; SCHWARZ; SILLEY et al. 2013; LISTER; HORSWILL 2014), facilmente transmitida por contato direto, possui capacidade de evoluir e adaptar-se a múltiplas configurações, por meio de seus fatores de resistência intrínsecos ou por

meio de mutações (MAGALHÃES; JORGE; PEREIRA et al. 2019). *E. coli* está incluída na microbiota normal intestinal dos humanos, mas pode tornar-se oportunista e causar infecções quando as defesas do organismo estiverem comprometidas (MURRAY et al., 2015).

Aliado à capacidade de mutação e adaptação, há o problema da resistência por conta do uso extensivo (EBBENSGAARD et al., 2015) e, muitas vezes, indevido de medicamentos (LLOR; BJERRUM, 2014), o que faz necessária a busca contínua por novas opções de antimicrobianos. Peptídeos com capacidade bactericida ou bacteriostáticos podem ser obtidos a partir da hidrólise enzimática *in vitro* de diferentes proteínas do leite por diferentes enzimas, incluindo as do trato gastrointestinal, as quais produzem peptídeos que podem vir a exibir atividades antibacterianas superiores aos peptídeos nativos.

Tendo em vista que o leite de cabra é fonte de uma variedade de proteínas e a necessidade de ampliar as opções de antimicrobianos para o combate a bacterioses, o presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana de proteínas e de peptídeos do leite caprino, gerados por hidrólise enzimática *in vitro* de forma sequencial e controlada (temperatura, pH) utilizando pepsina e tripsina, frente à *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO

As amostras de leite de caprino foram obtidas de cabras alocadas no Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, no município de Bananeiras / PB. As amostras coletadas foram obtidas de um rebanho homogêneo de cabras, com \pm 30 dias de lactação, correspondendo à fase do pico de lactação, filtradas, desnatadas por centrifugação refrigerada e, em seguida, armazenadas a -4 °C até o início das análises subsequentes.

2.2 FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO LEITE

O leite caprino previamente desnatado foi submetido ao fracionamento das proteínas por meio de precipitação isoelétrica das caseínas, mediante a adição de ácido clorídrico 1 M, até atingirem o pH 4,1 (CEBALLOS et al., 2009). Após a precipitação ácida foi obtida uma fração solúvel, correspondente ao soro (S), e o precipitado,

correspondente às caseínas (PC) separados posteriormente por centrifugação. As caseínas foram ressolubilizadas com NaOH até atingir o pH 8,0 para dosagem das proteínas solúveis. Após, o PC foi dialisado contra água destilada, congelado a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizado ($-80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e armazenado a $18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização.

2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR PROTÉICO SOLÚVEL

O teor de proteínas solúveis existentes no PC foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976). Primeiramente, a cada $100\text{ }\mu\text{L}$ de amostra foi adicionado $2,5\text{ mL}$ de reagente de BRADFORD. Após isto, a mistura foi agitada e posteriormente deixada em repouso por 10 min antes de realizar a leitura a 595 nm em espectrofotômetro. A albumina serica bovina (BSA) foi utilizada como padrão.

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* DAS CASEÍNAS DO LEITE CAPRINO

O PC liofilizado foi submetido à hidrólise enzimática *in vitro*, com pepsina seguida de tripsina, segundo a metodologia de Ahmed et al. (2015), com modificações. O PC liofilizado foi solubilizado em água destilada e seu pH ajustado para 2,0. Em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min para a esterilização de microrganismos e incubada com pepsina, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, na proporção 1:50 (enzima-substrato, m/m), durante 30 min em agitação constante. Ao término, o sistema foi mantido em banho de gelo e o seu pH foi reajustado para 8,0 e adicionado tripsina, na proporção 1:50. A amostra foi novamente submetida à agitação, agora por mais 1 h, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao término deste período, a reação foi inativada por aquecimento a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, seguido do resfriamento em banho de gelo e centrifugação. O sobrenadante, correspondente ao hidrolisado, foi dialisado em membrana de 500 Da e liofilizado.

2.5 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO LEITE CAPRINO

Para identificação das proteínas do leite caprino, do PC e do soro, a SDS-PAGE foi realizada utilizando o gel de empilhamento preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida (m / v) e o gel de separação na concentração de 20% (m / v). O gel foi corado com *Coomassie blue* R-250 para visualização das proteínas (LAEMMLI, 1970). A massa molecular das proteínas foi determinada com referência no marcador de massa molecular utilizando como padrão proteico uma faixa de 225 kDa a 12 kDa (Amersham ECL Rainbow Molecular Full Range, GE Healthcare Life Sciences).

2.6 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS NO HIDROLISADO CASEÍNICO

A identificação dos peptídeos no hidrolisado caseínico (HC) foi realizada por SDS-PAGE na presença de tricina, como descrito por Schägger; Jagow (1987). Para polimerização do gel foram utilizadas soluções de dois monômeros (acrilamida/bisacrilamida) em três diferentes concentrações: 4% e 3% no gel de aplicação da amostra, 10 % e 3 % para o gel de espaçamento e 17,5% e 3% para o gel de separação.

A corrida das proteínas no gel de SDS-PAGE com tricina ocorreu sob amperagem constante (25 mA) e, ao final da corrida, o gel foi retirado da placa e fixado por uma hora com solução de metanol, ácido acético e água (5/1/4) e corado com *Coomassie brilliant blue R-250* 0,005%. A remoção do excesso de corante ocorreu com ácido acético 10%. Para a detecção das massas moleculares das bandas visíveis no gel foi utilizado um marcador (GE Healthcare Life Sciences) de baixa massa molecular, de faixa de 3,5 kDa a 38 kDa.

2.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

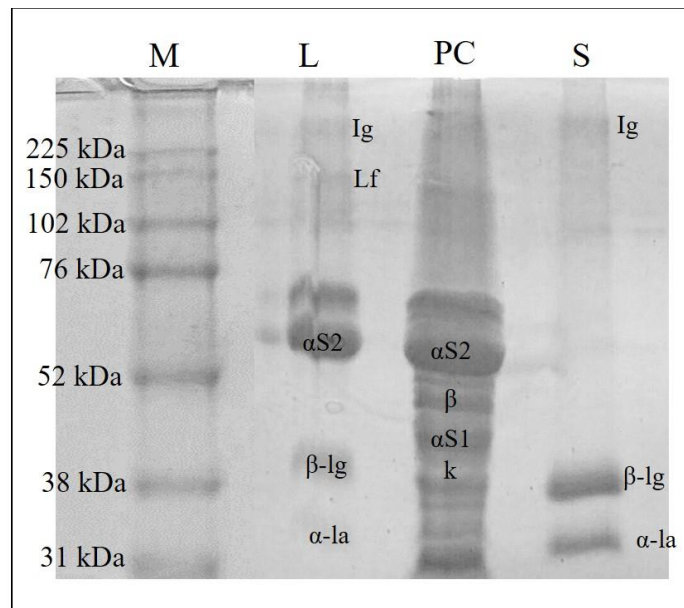
A atividade antibacteriana do PC e do HC produzido por meio da digestão com pepsina seguida de tripsina foi testada segundo as normas do protocolo M7-A6 do National Comitê For Clinical Laboratory Standards – NCCLS (2003), com a técnica de microdiluição, contra as linhagens de bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As cepas, armazenadas a 4 °C, foram colocadas para crescer em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37 °C, por 18 h. Para os testes foram utilizado microplacas do tipo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de fundo chato com 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL de caldo BHI, em seguida, foram distribuídos 90 µL das amostras PC (3 mg/mL) ou HC, desta mistura, foram realizadas diluições seriadas em triplicata. Em seguida, foram adicionados 10 µL de suspensão bacteriana (10^6 UFC mL⁻¹) em cada poço com a amostra diluída no meio. Foram feitos dois controles, o negativo, contendo apenas BHI, e positivo, com bactéria e o BHI. O material foi incubado a 37 °C em um leitor de microplacas, e o crescimento bacteriano foi monitorado pela medida da absorbância a 630 nm, a cada 60 min, durante 18 h.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A SDS-PAGE separa proteínas em um gel em função da massa molecular com base na habilidade de migração por meio da aplicação de um campo elétrico (ROY;

KUMAR, 2014). As proteínas do leite de caprino foram fracionadas em caseínas e soro por precipitação isoelétrica, e o seu perfil eletroforético é apresentado na figura 1.

Figura 1: SDS-PAGE do leite caprino coletado de animais com \pm 30 dias de lactação, do precipitado de caseína e do soro obtidos por precipitação isoelétrica em pH 4,1. M: Marcador de alto massa molecular (225 a 12 kDa); L: Leite caprino; PC: Precipitado de caseína; S: Soro do leite caprino; β -Ig: β -lactoglobulina; α -la: α -lactoalbumina; α S1: caseína α S1; α S2: caseína α S2, β : caseína β ; k: caseína kappa.



A SDS-PAGE (Fig. 1) mostra o perfil das principais proteínas referente ao leite caprino (L), onde podemos identificar proteínas com massas moleculares de aproximadas de ~225 kDa (imunoglobulina), ~150 kDa (lactoferrina), ~70 kDa (caseína α S2), ~40 kDa (β -lactoglobulina) e de ~33 kDa (α -lactoalbumina), quando comparado aos dados da literatura.

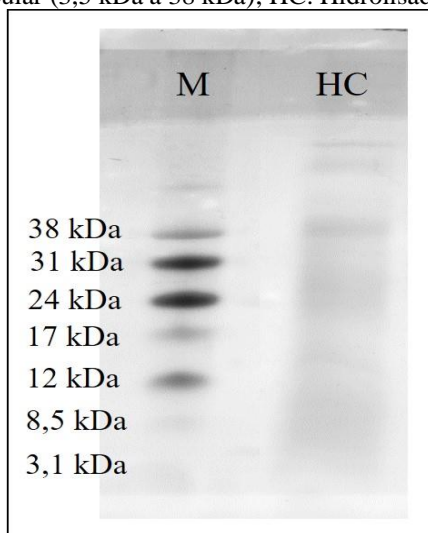
O precipitado caseínico apresenta um número maior de bandas de massa molecular aparente e com melhor visualização referente às caseínas α S1, α S2, β e kappa, corroborando com os estudos de Egito (2006). O soro do leite caprino apresenta as proteínas lactoferrina de ~80 kDa e a albumina com ~66,8 kDa sendo apenas visualizado as bandas referente às β -lactoglobulina (~40 kDa) e de α -lactoalbumina (~33 kDa). O perfil das proteínas presentes no soro do leite caprino possui similaridade quando comparado ao perfil proteico do leite bovino (HARAGUCHI et al., 2006).

Além da precipitação isoelétrica ter separado e concentrado as proteínas de cada grupo, estima-se que cerca 80% das proteínas lácteas correspondam às caseínas, e 20% às do soro (DAVOODI et al., 2016), o que pode explicar o resultado da SDS-

PAGE, onde o poço referente ao PC possui um número maior bandas que o do soro. Muitas proteínas do leite apresentam massas moleculares aproximadas o que deve provocar sobreposição ocasionando menores quantidades de bandas no gel do que seria esperado.

Através da SDS-PAGE na presença de tricina do hidrolisado caseínico com pepsina seguida de tripsina (Fig.2) é possível constatar a ocorrência da hidrólise das proteínas naturais, onde podemos observar bandas de baixa massa molecular, aproximadamente de ~33 kDa, e de ~17 e 8,5 kDa, não visualizadas no PC, o que corresponde a peptídeos gerados após a digestão das proteínas de massa molecular entre ~ 225 a 33 kDa do precipitado e em diferentes extensões.

Figura 2: SDS-PAGE na presença de tricina do hidrolisado caseínico, produzido a partir da digestão do precipitado de caseína com pepsina seguida de tripsina, mostrando o perfil do peptídeos formados. M: Marcador de baixo peso molecular (3,5 kDa a 38 kDa); HC: Hidrolisado Caseínico.



A atividade antimicrobiana foi realizada no PC do pico de lactação e em seu hidrolisado frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. O desenvolvimento das populações bacterianas no meio de cultura BHI incubado a 37 °C foi analisado durante 18 h, por meio de densidade óptica, forma de determinar a concentração de biomassa de organismos unicelulares.

Ao comparar a ação do PC, correspondente a um *pool* de proteínas nativas, nas três cepas usadas, verificamos que a amostra proporcionou redução do crescimento microbiano para *E. coli*, mas não para as cepas *P. aeruginosa* e *S. aureus*, onde para estas, é possível que o precipitado tenha sido usado como suprimento alimentício, já que houve aumento o seu crescimento. Os peptídeos obtidos por hidrólise foram capaz de reduzir o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Figuras 3 – 5).

Figura 3: Efeito das caseínas do pico de lactação caprino e do hidrolisado caseínico, produzido com pepsina seguida de tripsina, sobre o crescimento de *Escherichia coli*. Os gráficos apresentam a leitura das densidades ópticas a 630 nm em função do tempo avaliado. Em A: efeito do precipitado de caseínas do pico de lactação caprino sobre o crescimento de *E. coli*; Em B: efeito do hidrolisado sobre o crescimento de *E. coli*. PC: precipitado de caseína; HC: hidrolisado caseínico produzido com pepsina seguida de tripsina. A linha tracejada representa o controle positivo (bactéria + meio) e a linha contínua, a bactéria incubada com a amostra.

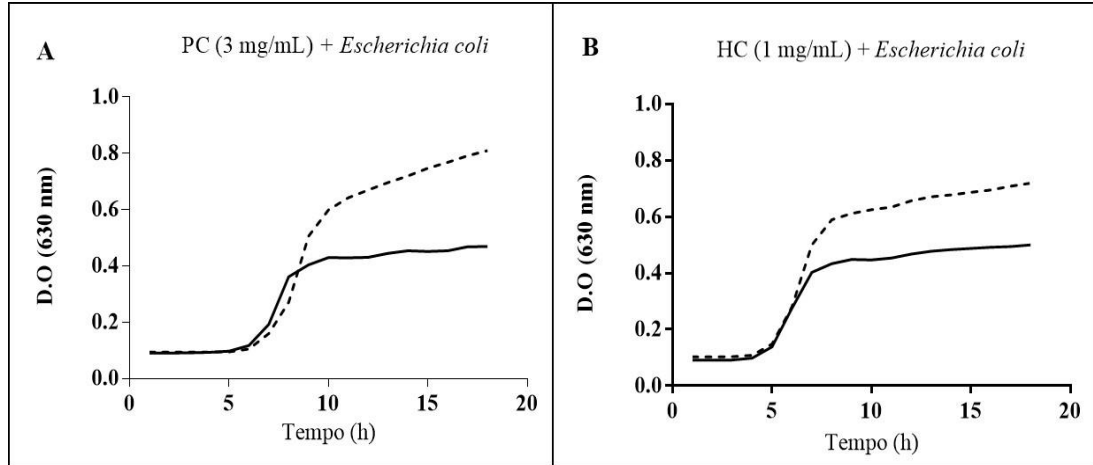


Figura 4: Efeito das caseínas do pico de lactação caprino e do hidrolisado caseínico, produzido com pepsina seguida de tripsina, sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Os gráficos apresentam a leitura das densidades ópticas a 630 nm em função do tempo avaliado. Em A: efeito do precipitado de caseínas do pico de lactação caprino sobre o crescimento de *P. aeruginosa*; Em B: efeito do hidrolisado sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. PC: precipitado de caseínas; HC: hidrolisado caseínico produzido com pepsina seguida de tripsina. A linha tracejada representa o controle positivo (bactéria + meio) e a linha contínua, a bactéria incubada com a amostra.

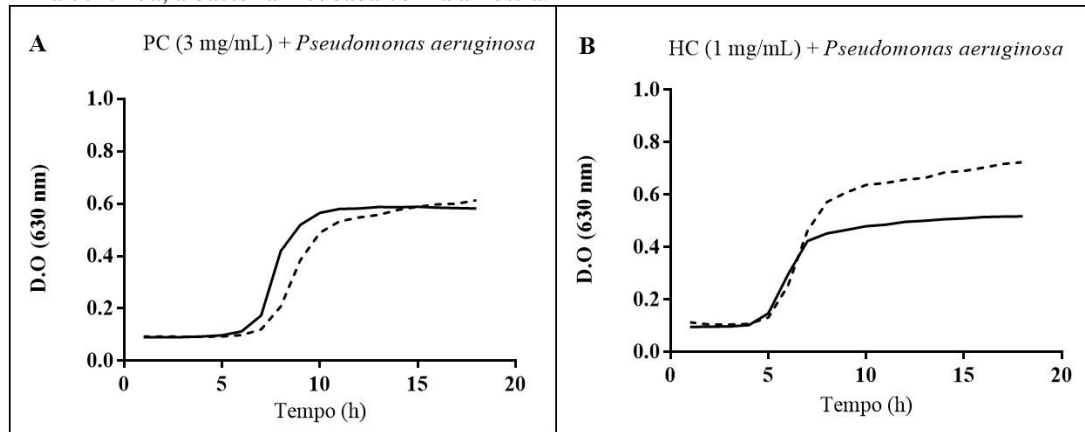
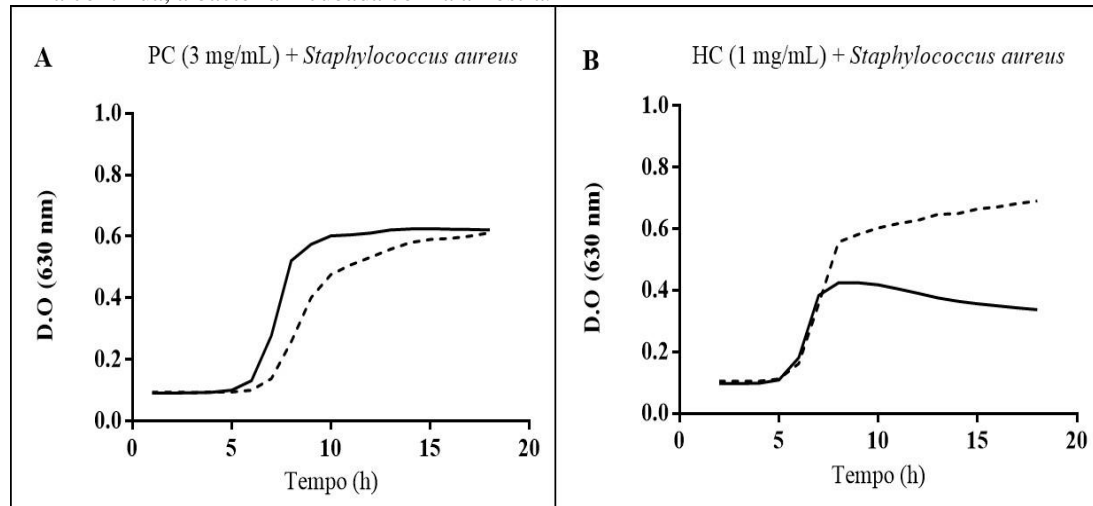


Figura 5: Efeito das caseínas do pico de lactação caprino e do hidrolisado caseínico, produzido com pepsina seguida de tripsina, sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os gráficos apresentam a leitura das densidades ópticas a 630 nm em função do tempo avaliado. Em A: Efeito do precipitado de caseínas do pico de lactação caprino sobre o crescimento de *S. aureus*; Em B: efeito do hidrolisado sobre o crescimento de *S. aureus*. PC: precipitado de caseínas; HC: hidrolisado caseínico produzido com pepsina seguida de tripsina. A linha tracejada representa o controle positivo (bactéria + meio) e a linha contínua, a bactéria incubada com a amostra.



É possível que os peptídeos gerados por hidrólise com pepsina e tripsina atuem sobre os microrganismos patogênicos melhor do que proteínas nativas, sendo um primeiro fator a justificar a importância da hidrólise e a possibilidade de seu uso, ampliando a disponibilidade de antimicrobianos para o combate a bactérias patogênicas (WANG, RUIXUE et al. 2020). Verificamos que os hidrolisados obtidos com pepsina seguido de tripsina reduzem o crescimento bacteriano em concentrações menores (1 mg/mL) do que o precipitado (3 mg/mL). As bactérias do tipo *E.coli* tiveram uma contenção no seu crescimento com o uso dos peptídeos e do precipitado de caseínas. Para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, o crescimento foi reduzido apenas com ação do hidrolisado.

Entre os vários mecanismos hipotéticos de peptídeos antimicrobianos estão o dano à membrana bacteriana e/ou alteração da sua permeabilidade. Ao penetrarem nas células, os peptídeos podem se acumular no meio intracelular e atacar o DNA ou o RNA, afetando processos fisiológicos como a síntese de proteínas e da parede celular, tendo a sua produção interrompidas, induzindo a morte celular (LEI et al., 2019).

Outra condição que fundamenta a relevância da hidrólise e as expectativas de seu uso é a boa solubilidade em água em relação a proteínas nativas, o que pois influencia na biodisponibilidade, fator indispensável para o alcance da concentração desejada na circulação sistêmica e para a obtenção de uma resposta terapêutica ideal,

que pode ser alcançada com menores quantidades de amostra (COLTESCU, SARAC 2020). Para a indústria farmacêutica, a solubilidade é uma propriedade significativa, já que as aplicações medicamentosas geralmente requerem amostras de proteínas com altas concentrações para obter uma resposta satisfatória (KRAMER et al. 2012; BOYD et al. 2019; COLTESCU et al. 2020).

Embora alguns estudos evidenciam que as proteínas do leite caprino foram capazes de inibir o crescimento bacteriano das cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (RONCADA et al., 2012; da COSTA et al., 2014), outros descrevem que a ausência do efeito inibitório provavelmente ocorre porque as proteínas do leite possuem uma atividade fisiológica latente codificada em sua estrutura primária, que se torna mais ativa quando a proteína é cortada durante a digestão ou a fermentação (MURATA et al., 2013). O menor tamanho dos peptídeos facilita sua ação rápida contra patógenos (MOHANTY et al., 2015; MOHANTY; JENA; CHOUDHURY, 2016).

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

Estudos com peptídeos formados a partir do leite bovino relatam que a região C-terminal carregada positivamente mostra atividade contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Porém, a quebra da cadeia ininterrupta na região C-terminal da proteína intacta proporcionaria um aumento na atividade antimicrobiana das caseínas de leite caprino (da COSTA et al, 2014).

Embora estudos mais detalhados sejam necessários para saber a natureza aminoacídica dos peptídeos obtidos e o seu mecanismo de ação nas bactérias, o estudo aqui relatado encoraja a exploração de outras fontes de antimicrobianos.

4 CONCLUSÃO

As proteínas nativas do precipitado de caseína do leite caprino coletado durante a fase de pico de lactação reduziu o crescimento da bactéria *E. Coli*. O hidrolisado obtido por meio da digestão com pesina seguida de tripsina reduziu o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os dados deste estudo indicam que é possível obter novos peptídeos com potencial antibacteriano por hidrólise enzimática *in vitro* do precipitado de caseína do leite de cabra, oferecendo novas perspectivas para o combate a bactérias Gram-negativas e Gram positivas altamente patogênicas e resistentes a antimicrobianos disponíveis no mercado. O leite caprino é uma fonte promissora de peptideos bioativos com multiplas funcionalidades, podendo ser explorado pela indústria farmacêutica e, até mesmo, pela indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. S.; T. EL-BASSIONY; L. M. ELMALT; H. R. IBRAHIM. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, v.74, p.80-88. 2015.
- BATISTA, N. L.; DE SOUZA, B. B. Caprinovinocultura no semiárido brasileiro-fatores limitantes e ações de mitigação. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 1, p. 1-9, 2015.
- BOYD, B. J. et al. Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 137, p. 104967, 2019.
- 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, n.1-2, p.248-254. 1976.
- BROWN, A. N. et al. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 8, p. 2768-2774, 2012.
- CEBALLOS, S. L. et al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, p. 322–329, 2009.
- CHAKRABARTI, S; GUHA, S; MAJUMDER, K. Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, v. 10, n. 1738, p. 1-17, 2018.
- COLTESCU, A.; BUTNARIU, M.; SARAC, I. The Importance of Solubility for New Drug Molecules. *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 13, n. 2, p. 577-583, 2020.
- DA COSTA et al. Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PloS One*, v.9, n.3, p.e93361. 2014.
- DAVOODI, S. H., Shahbazi, R., Esmaeili, S., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., Jazayeri, S., & Taslimi, A. (2016). Health-related aspects of milk proteins. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 15(3), 573.
- De OLIVEIRA, M. F. M.; GOMES, R. C.; BARBOSA, M. M. Aceitabilidade e intenção de compra do creme de leite de cabra. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 12, p. 103196-103206, 2020.
- DO EGITO, A. S. et al. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2006.

EBBENSGAARD, A. et al. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PloS One*, v. 10, n. 12, p. e0144611, 2015.

ESMAEILPOUR, M. et al. Antimicrobial peptides derived from goat's milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Biosciences and Technology*, v. 7, n. 1, p. 65-72, 2017.

GUHA, S.; SHARMA, H.; DESHWAL, G. K. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Prod Process and Nutrition*, v. 3, n. 2, 2021.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

JOHANSSON, M.; M. HÖGBERG; A. ANDRÉN. Relation Between α S1-Casein Content and Coagulation Properties of Milk from Swedish Dairy Goats. *The Open Food Science Journal*, v.9, n.1. 2015.

KRAMER, R. M. et al. Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, v. 102, n. 8, p. 1907-1915, 2012.

KUSUMANINGTYAS, E. et al. Antimicrobial and antioxidative activities of peptides from goat milk hydrolyzed with various protease. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences*, v. 20, n. 3, p. 1-9, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, v. 11, n. 7, p. 3919-3031, 2019.

LLOR, C.; BJERRUM, L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, v. 5, n. 6, p. 229-241, 2014.

MAGALHÃES, A. P.; JORGE, P.; PEREIRA, M. O. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* communication in biofilm infections: insights through network and database construction. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 45, n. 5-6, p. 712-728, 2019.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016.

MOHANTY, D. et al. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties*, v. 19, n. 4, p. 837-846, 2016.

MURATA, M. et al. Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. *Journal of Dairy Science*, v.96, n.8, p.4891-4898. 2013.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiología Médica*: Elsevier Brasil. 2015.

NCCLA – National Comite for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard - 6th ed. NCCLS document M7 – A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NOMURA, K.; YONEZAWA, T.; MANO, S.; KAWAKAMI, S.; SHEDLOCK, A. M.; HASEGAWA, M.; AMANO, T. Domestication process of the goat revealed by an analysis of the nearly complete mitochondrial protein-encoding genes. *PloS One*, v. 8, n. 8, p; 1-15, 2013.

PEREIRA, Renata ÂG et al. Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social" Pacto Novo Cariri" no Estado da Paraíba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p. 205-211, 2005.

ROY, S.; KUMAR, V. A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*, v. 3, n. 8, p. 955-960, 2014.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SHARMA, K. et al. *Exserohilum rostratum*: characterization of a cross-kingdom pathogen of plants and humans. *PLoS One*, v. 9, n. 10, p. 1-10, 2014.

SHEN, K. et al. Extensive genomic plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* revealed by identification and distribution studies of novel genes among clinical isolates. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 9, p. 5272-5283, 2006.

SILBY, M. W. et al. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, n. 4, p. 652-680, 2011.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen?. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 4, p. 117-139, 2013.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, p. 178, 2014.

ROJAS-RONQUILLO, M. Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas, liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. Tesis de doctorado. México, DF Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, 2012.

RONCADA, P.; C. PIRAS; A. SOGGIU; R. TURK; A. URBANI ; L. BONIZZI. Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, v.75, n.14, p.4259-4274. 2012.

SALAMI, M.; R. YOUSEFI; M. R. EHSANI; M. DALGALARRONDO; J.-M. CHOBERT; T. HAERTLÉ; S. H. RAZAVI; A. A. SABOURY; A. NIASARI-NASLAJI; A. A. MOOSAVI-MOVAHEDI. Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, v.18, n.12, p.1097-1102. 2008.

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

SGARBIERI, V. C. Food Proteins and Bioactive Peptides, Functional Diets. *Journal of Food Science & Nutrition*, v. 3, n. 23, p. 1-14, 2017.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.8, n.1, p.43-56. 2005.

WANG, R. et al. Antibacterial Activity of Trypsin-Hydrolyzed Camel and Cow Whey and Their Fractions. *Animals*, v. 10, n. 337, p. 1-13, 2020.