



TATIANA LOPES FIALHO

**IDENTIFICAÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DE PEPTÍDEOS DE QUEIJO MINAS
ARTESANAL DA CANASTRA**

**LAVRAS – MG
2015**

TATIANA LOPES FIALHO

**IDENTIFICAÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Coorientadoras

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Dra. Maria Cristina Baracat-Pereira

LAVRAS -MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Fialho, Tatiana Lopes.

Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo
Mínas artesanal da Canastra: Identificação e ação antimicrobiana de
peptídeos de queijo Mínas artesanal da Canastra / Tatiana Lopes
Fialho. – Lavras: UFLA, 2015.

97 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador (a): Luiz Ronaldo de Abreu.

Bibliografia.

1. Peptídeo antimicrobiano. 2. Queijo Canastra. 3. MALDI-
TOF/TOF. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

TATIANA LOPES FIALHO

**IDENTIFICAÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA, em 23 de fevereiro de 2015.

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dra. Maria Cristina Baracat-Pereira	UFV

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu
Orientador

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Dra. Maria Cristina Baracat-Pereira
Coorientadoras

**LAVRAS -MG
2015**

Aos meus pais, Cida e Airton, que não mediram esforços para a minha conquista. Ao meu irmão Gleiser, por sempre acreditar em mim. Sem vocês eu não conseguiria. Muito obrigada!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar todos os meus passos e permitir a conquista de mais esta vitória em minha vida.

Aos meus pais, Cida e Airton pelo amor incondicional, dedicação, incentivo, orações e por nunca medirem esforços para o alcance do meu sucesso. Vocês são os meus maiores exemplos de vida. Amo vocês!

Ao meu irmão Gleiser, pelo amor, carinho, confiança e incentivo durante todos os momentos da minha vida. Amo você!

Ao meu namorado Eudes, pelo amor, atenção, companheirismo e por sempre acreditar em mim. Agradeço e reconheço que foi indispensável a sua presença ao meu lado durante essa caminhada.

Ao professor e orientador Luiz Ronaldo de Abreu, pela oportunidade, confiança, amizade, dedicação, apoio e por sempre me ouvir.

À professora e coorientadora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela confiança, dedicação, amizade, atenção e pelos conhecimentos repassados.

À professora e coorientadora Maria Cristina Baracat-Pereira, por acreditar em meu trabalho, mesmo antes de realmente me conhecer, pela dedicação, amizade, confiança e ensinamentos repassados.

Ao professor Cleiton Antônio Nunes, pelo apoio, atenção e dedicação.

Aos produtores da região da Canastra, pela disponibilidade dos queijos, permitindo a realização deste trabalho, em especial, ao Paulo, que auxiliou na coleta e transporte do produto à UFLA.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol), pela estrutura física para a realização deste trabalho, em especial ao Edvaldo, pela atenção e apoio.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Laticínios (DTA/UFLA), Raquel, Sérgio, Marcel, Giovanna, Ranyele, Amilcar e Frederico, pela ajuda profissional sem medir esforços, pelos momentos alegres e descontraídos, pelas palavras de incentivo em momentos tensos e inseguros, enfim pela amizade.

À técnica do Laboratório de Laticínios, Creuza P. A. Resende, pelo acolhimento, amizade, orações e palavras sábias.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCA/UFLA), pela ajuda profissional e, em especial à Nayane, pela amizade, apoio, atenção e alegria contagiante.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP-DBB e BIOAGRO/UFV), pelo acolhimento e amizade e, em especial à Lanna e o Marcos Jorge, pela dedicação, atenção, apoio e ajuda profissional imprescindível à execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora (Luiz Ronaldo, Maria Cristina e Roberta), pela disposição, correções e sugestões.

Às amigas de república, Viviane, Gabriella e Anita, pelo companheirismo, apoio, pela amizade e pelos momentos felizes e descontraídos vividos em Lavras.

Aos meus amigos Hiasmyne e Naaman, pela amizade desde a graduação, pelo apoio, companheirismo e por sempre torcerem por mim.

Aos professores, laboratoristas e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela atenção, colaboração e dedicação.

À Universidade Federal de Lavras junto ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

Obrigada a todos que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho.

Tatiana

RESUMO

Amostras de queijo Minas artesanal da Canastra de três produtores situados na cidade de Medeiros – MG foram avaliadas quanto à presença de peptídeos antimicrobianos ao longo de 30 dias após a fabricação. Proteínas e peptídeos solúveis extraídos dos queijos, cuja concentração variou de 2,05 a 5,13 μg de proteínas e peptídeos solúveis/ μL de solução, foram fracionados por cromatografia líquida de fase reversa e as frações coletadas foram avaliadas quanto à ação inibitória do crescimento de *E. coli*. As frações com ação antimicrobiana pertencentes ao segundo lote do queijo A e primeiro lote do queijo C, cujas concentrações variaram de 25 a 46 μg de proteínas e peptídeos solúveis/mL de solução, foram encaminhadas ao MALDI-TOF/TOF e em seguida os peptídeos foram sequenciados e identificados usando MASCOT DAEMON em comparação ao banco de dados UniProt. As sequências peptídicas RPKHPIKHQ, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQGLPQ e RPKHPIKHQGLPQE, identificadas como referentes à proteína α_{s1} -caseína, são fragmentos pertencentes à Isracidina, um peptídeo com ação antimicrobiana comprovada. Os peptídeos HQPHQPLPPT e MHQPHQPLPPT identificados são originados da proteína β -caseína e, apesar de terem sido isolados em outros estudos, as suas atividades biológicas ainda são desconhecidas. A validação dos peptídeos identificados foi realizada pelo aplicativo SCAFFOLD.

Palavras-chave: Peptídeo antimicrobiano. Queijo Canastra. MALDI-TOF/TOF.

ABSTRACT

Artisanal Minas cheese samples from *Canastra* of three producers located in the city of Medeiros - MG were evaluated for the antimicrobial peptides presence during 30 days after manufacture. Proteins and peptides soluble extracted from cheeses, which concentration ranged from 2.05 to 5.13 μg of proteins and peptides soluble/ μL of solution were fractionated by liquid chromatography of reverse phase and the collected fractions were evaluated as the growth inhibitory action of *E. coli*. Fractions with antimicrobial action belonging to the second batch of the cheese A and the first batch of the cheese C, which concentrations ranged from 25 to 46 μg of protein and peptides soluble/mL of solution were sent to the MALDI-TOF/TOF and then, peptides were sequenced and identified using MASCOT DAEMON compared to the database UniProt. The peptide sequences RPKHPIKHQ, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQGLPQ and RPKHPIKHQGLPQE, identified as related to α_{s1} -casein protein are fragments belonging to Isracidine, a peptide with confirmed antimicrobial action. The peptides HQPHQLPPT and MHQPHQLPPT identified are derived from β -casein protein and, despite being isolated in other studies, their biological activities are unknown. The peptides validation identified was performed using SCAFFOLD application.

Keywords: Antimicrobial peptide. *Canastra* Cheese. MALDI-TOF/TOF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hidrólise das proteínas de origem alimentar pelo sistema proteolítico das bactérias do ácido láctico ou por várias enzimas digestivas, durante o processo de digestão	18
Figura 2	Mapa das principais regiões produtoras do queijo Minas artesanal..	29
Figura 3	Mapa da microrregião da Canastra, produtora do queijo Minas artesanal	34
Figura 4	Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal da Canastra	37
Figura 5	Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos protéicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor A (Lote 01)	56
Figura 6	Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor A (Lote 02)	58
Figura 7	Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos protéicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados produtor B (Lote 01)	60
Figura 8	Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos protéicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor B (Lote 02).....	62
Figura 9	Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos protéicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor C (Lote 01).....	64
Figura 10	Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos protéicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor C (Lote 02).....	66

Figura 11	Perfil da cromatografia líquida de fase reversa de proteínas e peptídeos solúveis extraídos dos queijos Canastra	68
Figura 12	Espectro de massas no modo MS1 em MALDI-TOF/TOF das frações peptídicas com características antimicrobianas	70
Figura 13	Espectro de massas no modo MS2 em MALDI-TOF/TOF da fração peptídica com atividade antimicrobiana referente ao queijo do produtor A com 9 dias de maturação (Lote 02)	73
Figura 14	Espectro de massas no modo MS2 em MALDI-TOF/TOF da fração peptídica com atividade antimicrobiana referente ao queijo do produtor C com 23 dias de maturação (Lote 01)	74
Figura 15	Espectro de massas no modo MS2 em MALDI-TOF/TOF da fração peptídica com atividade antimicrobiana referente ao queijo do produtor C com 30 dias de maturação (Lote 01)	76
Figura 16	Alinhamento de sequências aminoacídicas de proteínas α_{s1} -caseína (A) e β -caseína (B) comparado aos peptídeos identificados do queijo Canastra.....	77
Figura 17	Alinhamento de sequências aminoacídicas do peptídeo isracidina derivado da α_{s1} -caseína comparado aos peptídeos identificados no queijo Canastra	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das principais proteínas do leite de origem bovina...	20
Tabela 2	Ingredientes funcionais e produtos lácteos comerciais fundamentados em peptídeos bioativos	22
Tabela 3	Características microbiológicas e físico-químicas estabelecidas pelo Decreto nº 44.864/2008	31
Tabela 4	Características gerais dos municípios produtores do queijo Minas artesanal Região da Canastra - 2004	35
Tabela 5	Características rurais dos municípios produtores do queijo Minas artesanal da Canastra - 2004	35
Tabela 6	Matriz de Experimentos	41
Tabela 7	Valores médios* de pH, umidade, proteína total, extensão e profundidade de maturação do queijo Canastra ao longo de 30 dias de maturação	51
Tabela 8	Concentração média* de proteínas e peptídeos solúveis extraídos do queijo Canastra ao longo de 30 dias de maturação	53
Tabela 9	Atividade antimicrobiana dos eluatos peptídicos solúveis extraídos do queijo Minas artesanal da Canastra contra <i>E. coli</i>	67
Tabela 10	Identificação de peptídeos solúveis extraídos dos queijos Minas artesanal da Canastra	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Peptídeos bioativos	17
2.1.1	Peptídeos bioativos derivados do leite	19
2.1.2	Peptídeos bioativos derivados de queijo	23
2.2	Peptídeos antimicrobianos	25
2.2.1	Peptídeos antimicrobianos derivados do leite	26
2.3	Queijo artesanal do Estado de Minas Gerais	29
2.3.1	Queijo Minas Artesanal produzido na Região da Canastra	33
2.4	Processo de Maturação do queijo	38
2.4.1	Proteólise	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Queijo Minas artesanal da Canastra	41
3.2	Análises físico-químicas	42
3.2.1	Determinação da umidade	42
3.2.2	Determinação do pH	42
3.2.3	Determinação do nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%	43
3.2.4	Determinação da proteína	43
3.2.5	Determinação da extensão de maturação	43
3.2.6	Determinação da profundidade de maturação	43
3.3	Extração de proteínas e peptídeos solúveis	44
3.4	Quantificação das proteínas e peptídeos solúveis nos extratos	44
3.5	Separação cromatográfica dos extratos protéicos e peptídicos	45
3.6	Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas e peptídeos solúveis	46
3.6.1	Estocagem, preparo dos inóculos e padronização	46
3.6.2	Concentração mínima inibitória (MIC) de proteínas e peptídeos solúveis	47

3.7	Quantificação de proteínas e peptídeos solúveis presentes nas frações.....	49
3.8	Identificação dos peptídeos solúveis presentes nas frações	49
3.9	Análise estatística	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais da Canastra	51
4.2	Concentração de proteínas e peptídeos solúveis no extrato	53
4.3	Perfil cromatográfico dos extratos protéicos e peptídicos.....	54
4.4	Atividade antimicrobiana das proteínas e peptídeos solúveis.....	67
4.5	Identificação de Peptídeos solúveis	70
5	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A sociedade tem focado a melhoria da qualidade de vida, buscando alimentos que, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, se caracterizam por oferecer benefícios à saúde, chamados alimentos funcionais.

Uma das maneiras do alimento atingir beneficentemente as funções-alvo no corpo humano é pela ação de peptídeos bioativos presentes nos alimentos, ou seja, fragmentos específicos de proteínas que podem produzir diferentes efeitos biológicos, bioquímicos e fisiológicos no organismo humano, favorecendo a saúde.

Os peptídeos bioativos são reconhecidos pelo organismo como componentes naturais, fazendo parte da alimentação cotidiana dos indivíduos. Seu consumo por tempo prolongado, em frequência e quantidade adequada, afeta os principais sistemas orgânicos – principalmente os sistemas cardiovascular, imune e nervoso.

As proteínas do leite (caseínas e proteínas solúveis) são consideradas fontes importantes de variedades de peptídeos bioativos que são liberados durante o processamento ou pela digestão gastrointestinal do leite.

O queijo é um produto lácteo rico em peptídeos bioativos devido à presença de microrganismos capazes de hidrolisar as proteínas durante o processamento, mais intensamente na maturação, ocasionando a liberação desses peptídeos com funções antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana, dentre outras.

O queijo Minas artesanal da Canastra, um produto obtido de leite cru e “pingo” (fermento natural obtido pela coleta do soro extraído dos queijos fabricados no dia anterior) apresentam um conjunto de microrganismos específicos encontrados somente na região da Canastra, sendo sua maturação caracterizada por intensa glicólise, lipólise e proteólise, originando compostos responsáveis pelas características de sabor, aroma e textura, além da ativação de peptídeos bioativos.

O queijo Minas artesanal é produzido com leite cru e o “pingo”, sendo vulnerável a contaminações microbiológicas. A presença dos peptídeos antimicrobianos no queijo Canastra apresenta vantagens, pois contribui para a eliminação de bactérias patogênicas e alteradoras do produto, aumentando a sua vida de prateleira, o que beneficia a saúde do consumidor, caracterizando-se como um alimento funcional.

No presente trabalho o objetivo geral foi identificar e avaliar a ação antimicrobiana de peptídeos de Queijo Minas Artesanal da Canastra. Os objetivos específicos foram: verificar a presença de peptídeos antimicrobianos no queijo Canastra no período de 2, 9, 16, 23 e 30 dias de maturação sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, identificar os peptídeos antimicrobianos por espectrometria de massas, sequenciamento automático e ferramentas de bioinformática e identificar as características do queijo Canastra que influenciaram na presença dos peptídeos antimicrobianos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Peptídeos bioativos

O ser humano, preocupado com a manutenção da sua saúde, vem buscando fontes naturais alternativas para a prevenção ou combate a doenças (SILVA, 2012). Assim, estudos e pesquisas vêm sendo desenvolvidos com foco na alimentação, buscando os alimentos funcionais (LIGNITTO et al., 2010; MEIRA et al., 2012; TIMÓN et al., 2014).

O termo “alimento funcional” foi descrito pela primeira vez durante a década de 1980, quando o governo japonês, no intuito de garantir boas condições de saúde para a população idosa, financiou um projeto de pesquisa nacional sobre as implicações das ciências médicas para a dieta (ARIAS-ARANDA; ROMEROSA-MARTINEZ, 2010).

Um alimento é considerado funcional quando, além de fornecer as funções nutricionais básicas, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benefícios à saúde, devendo ser seguro para consumo sem previsão médica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 1999).

Substâncias bioativas de origem alimentar são reconhecidas pelo organismo como componentes naturais, fazendo parte da alimentação cotidiana dos indivíduos. O seu consumo por tempo prolongado, em frequência e quantidade adequada, traz benefício à saúde, sendo considerado meio brando e seguro na prevenção de doenças (PACHECO; ANTUNES, 2009; PIHLANTO-LEPPALA et al., 2000).

As proteínas, além de exercerem funções nutricionais (fonte de aminoácidos para a síntese proteica e de energia) e tecnológicas (propriedades funcionais e sensoriais), possuem dentro da sua estrutura primária sequências de aminoácidos inativados, que ao sofrerem hidrólise, apresentam atividades biológicas, bioquímicas e fisiológicas no organismo humano, chamados de peptídeos bioativos. Dependendo da sequência dos aminoácidos, a proteína pode exibir atividade diversificada pela

ligação aos receptores no trato gastrointestinal ou em órgãos e tecidos-alvo, após a absorção para a corrente sanguínea (Figura 1) (HEBERT; SAAVEDRA; FERRANTI, 2010). Dipeptídeos e tripeptídeos são transportados por transportadores específicos, os oligopeptídeos são transportados por transcitoses e/ou vias paracelulares (FOLTZ et al., 2007; REGAZZO et al., 2010; SHIMIZU et al., 1999).

Os peptídeos bioativos podem desempenhar papel importante na regulação metabólica, sugerindo seu uso potencial como nutracêuticos e ingredientes funcionais para promover a saúde e reduzir o risco de doenças (CARPINO et al., 2011).

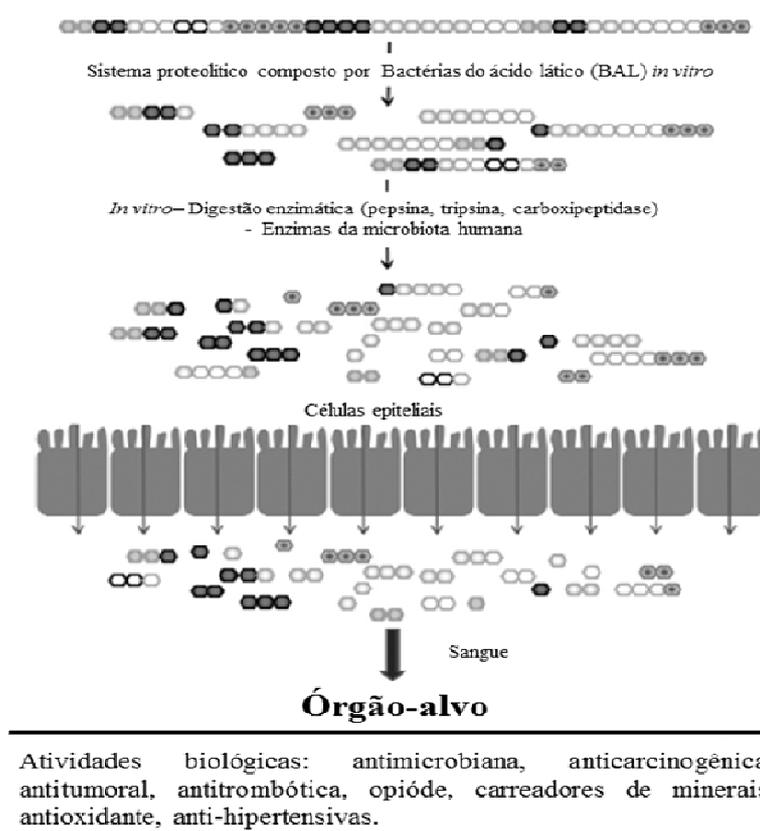


Figura 1 Hidrólise das proteínas de origem alimentar pelo sistema proteolítico das bactérias do ácido lático ou por várias enzimas digestivas, durante o processo de digestão

Fonte: Hebert, Saavedra e Ferranti (2010)

Peptídeos bioativos derivados de proteínas de origem bacteriana, vegetal e animal, contendo geralmente de 2 a 20 resíduos de aminoácidos, possuem propriedades opioides, antitrombóticas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, antimicrobianas, antigástricas, carreadora de minerais e de redução do colesterol (KORHONEN, 2009b; MEISEL, 1998; SILVA; MALCATA, 2005).

Pesquisas demonstram a liberação de peptídeos bioativos *in vitro*, porém estudos *in vivo*, utilizando animais como modelo são escassos. Experimentos avaliando a eficiência de peptídeos específicos, envolvendo seres humanos, são ainda mais escassos (BOUTROU et al., 2013; LIGNITTO et al., 2010; OHSAWA et al., 2008).

Devido à crescente consciência da influência da alimentação sobre a promoção da saúde, estudos têm surgido relatando o leite como potencial gerador de peptídeos bioativos (PIHLANTO; KORHONEN, 2003).

2.1.1 Peptídeos bioativos derivados do leite

Sob definição físico-química, o leite é considerado uma solução aquosa contendo sais minerais, lactose e outros compostos minoritários, no qual os glóbulos de gordura e proteínas (caseínas e proteínas solúveis) são dispersos em estado coloidal (FOX; MCSWEENEY, 1998).

As proteínas do leite são veículos naturais que apresentam micronutrientes essenciais como cálcio e fósforo, aminoácidos e componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina), no intuito de nutrir o recém-nascido (LIVNEY, 2010). Essas proteínas são divididas em dois grandes grupos, 80% de caseínas e 20% de proteínas solúveis (Tabela 1).

Tabela 1 Características das principais proteínas do leite de origem bovina

Proteína	Concentração no leite (g/L)	Resíduos de Aminoácido	Variante Genética ¹	Massa Molecular (Da)
CASEÍNAS				
α_{s1} -caseína	12-15	199	B	23.615
			C	23.542
α_{s2} -caseína	3-4	207	C	25.226
β -caseína	9-11	209	A	23.983
			B	24.092
κ -caseína	2-4	169	A	19.037
			B	19.006
PROTEÍNAS SOLÚVEIS				
α -lactoalbumina	0,6-1,7	123	B	14.178
β -lactoglobulina	2-4	162	A	18.363
			B	18.277
Albumina Sérica	0,4	582	A	66.399

¹Principais variantes.

Fonte: Farrell Júnio et al. (2004)

De acordo com Fox (2003), as micelas de caseína consistem de quatro proteínas principais: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína e, representam respectivamente 37%,10%, 35% e 15% do total de caseínas, sendo os 3% restantes representados pela γ -caseína, fração derivada da β -caseína. As proteínas solúveis, também denominadas proteínas do soro, permanecem solúveis no soro do leite após a precipitação da micela de caseína pela redução do pH do leite a 4,6 em 20°C (FARRELL JÚNIOR et al., 2006). A maioria dessas proteínas é globular, com elevada hidrofobicidade e cadeias peptídicas densamente dobradas (PHADUNGATH, 2005). A α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, em termos quantitativos são as principais proteínas desse grupo.

Ao longo das duas últimas décadas, pesquisas têm dado atenção especial às propriedades biológicas das proteínas do leite que possuem funções fisiológicas em

humanos, sendo atualmente a principal fonte de peptídeos biologicamente ativos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Os peptídeos bioativos estão inseridos de forma inativa na estrutura primária das proteínas do leite, podendo ser liberados durante a digestão gastrointestinal, ou por hidrólise enzimática e fermentação microbiana (KORHONEN, 2009a; KORHONEN; PIHLANTO, 2003).

A liberação desses peptídeos durante a digestão ocorre pela ação de enzimas digestivas, tais como tripsina, pepsina e quimotripsina, que hidrolisam as proteínas pela quebra das ligações peptídicas (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Boutrou et al. (2014) comprovaram a presença de peptídeos bioativos, derivados da caseína e das proteínas solúveis no jejuno humano.

Já a hidrólise enzimática ocorre por meio de proteases intrínsecas ou extrínsecas do alimento (VAN-BERESTEIJN et al., 1994), como por exemplo a plasmina no leite, que atua durante a síntese, processamento e armazenamento do leite.

Fermentos à base de bactérias do ácido láctico (BAL), como lactobacilos, lactococos e estreptococos são altamente proteolíticos. Durante a fermentação do leite, vários di, tri e oligopeptídeos são liberados por degradação principalmente das caseínas, utilizando-os como fontes de aminoácidos essenciais para estimular o crescimento bacteriano (JUILLARD et al., 1998). Em produtos lácteos fermentados, as bactérias lácticas contribuem mais intensamente para a degradação das caseínas, uma vez que após a lise microbiana, peptidases intracelulares são liberadas para o meio (THOMAS; PRITCHARD, 1987). As especificidades das peptidases conhecidas sugerem que todas as ligações peptídicas das caseínas podem ser clivadas (RYHANEN; PIHLANTO-LEPPALA; PAHKALA, 2001).

A aplicação de enzimas proteolíticas isoladas em laboratório é uma alternativa muito empregada para a liberação de peptídeos bioativos a partir da proteína do leite. Ueno, Mizuno e Yamamoto (2004) purificaram e caracterizaram

uma endopeptidase de *Lactobacillus helveticus* CM4, comprovando que essa peptidase pode produzir peptídeos anti-hipertensores, utilizando pró-peptídeos sintéticos como substratos. Essa técnica é muito vantajosa, pois é segura e apresenta baixo custo (MAO et al., 2007).

Diferentes técnicas podem ser aplicadas à identificação e caracterização de peptídeos bioativos: isolamento a partir de digestões gastrintestinal *in vivo* das proteínas precursoras, isolamento *in vitro* a partir de digestões enzimáticas de proteínas precursoras e a síntese química de peptídeos que têm uma estrutura idêntica à daquelas conhecidas por serem bioativas (BLONDELLE; LOHNER, 2000; MEISEL, 2001).

Publicações têm relatado o isolamento de peptídeos bioativos de produtos lácteos incluindo leite, kefir, iogurte e queijos (BHARWAJ; SINGH, 2014; PRITCHARD; PHILLIPS; KAILASAPATHY, 2010).

Alguns produtos lácteos e ingredientes com propostas funcionais fundamentados em peptídeos bioativos, obtidos a partir das proteínas do leite, já estão disponíveis no mercado (Tabela 2).

Tabela 2 Ingredientes funcionais e produtos lácteos comerciais fundamentados em peptídeos bioativos

Nome Comercial	Natureza do produto	Peptídeos Bioativos	Alegação de funcionalidade	Fabricantes
BioZate	Isolado de proteína do soro de leite hidrolisado	Fragmentos de β -lactoglobulina	Redução da pressão sanguínea	Davisco, EUA
CysteinPeptide	Ingrediente /hidrolisado	Derivados de proteína do leite	Aumento da energia e melhoria do sono	DMV International, Holanda
Vivinal Alpha	Ingrediente /hidrolisado	Peptídeos de soro de leite	Relaxante e auxilia o sono	Borculo Domo Ingredientes, Holanda

Fonte: Macedo e Macedo (2011)

A produção de alimentos funcionais contendo peptídeos bioativos apresenta a importante tarefa de aumentar a biodisponibilidade da sua fonte natural ou inovar alimentos por adição e/ou fortalecimento de frações isoladas ou enriquecidas de peptídeos bioativos (PHELANet al., 2009).

2.1.2 Peptídeos bioativos derivados de queijo

Os queijos apresentam quantidade elevada de proteínas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ -caseína) sob a ação de enzimas provenientes de culturas de bactérias lácticas específica, de enzimas naturais do leite e de enzimas adicionadas (quimosina), resultando em fonte diversificada de peptídeos bioativos (PIHLANTO, 2006). A proteólise é o principal fenômeno bioquímico que ocorre durante a maturação, gerando a formação de di, tri e oligopeptídeos que contribuem não só para o desenvolvimento de sabor, aroma e textura do queijo curado, mas também expõem atividade biológica sobre o aparelho digestivo, cardiovascular, imunológico e sistema nervoso (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). A proteólise varia de acordo com vários fatores: pH, tipos de enzimas naturais e adicionadas, tipo de fermento, teor de sal, umidade, tempo de maturação e temperatura (PARK; JIN, 1998). Nesse sentido, diferentes variedades de queijos possuem compostos com bioatividades variáveis (MEIRA et al., 2012).

Ong e Shah (2008) observaram que o queijo Cheddar, adicionado de cultura probiótica e maturado pelo período de 24 semanas, apresentou maior intensidade de proteólise quando comparado aos maturados sem cultura probiótica, conseqüentemente, maior nível de peptídeos anti-hipertensivos.

Gomez-Ruiz, Ramos e Recio (2002) estudaram os peptídeos anti-hipertensivos em Manchego, queijo espanhol fabricado a partir de leite de ovelha. Ao longo da pesquisa, constataram pouca atividade anti-hipertensiva nos primeiros quatro meses de maturação. Após, essa atividade foi aumentada e chegou ao máximo aos oito meses, diminuindo posteriormente aos 12 meses. Durante a maturação,

alguns peptídeos bioativos são quebrados em peptídeos menores ou em aminoácidos livres, perdendo a atividade bioativa (PRIPP et al.,2006).

Os peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) estão relacionados com a regulação sanguínea. A enzima pode aumentar a pressão arterial por meio da conversão do peptídeo angiotensina I para potente vasoconstritor, denominado angiotensina II. ACE também pode catalisar a degradação da bradicinina, um hormônio vasodilatador poderoso e permeabilizador da parede dos vasos. A inibição da ACE pode gerar, por consequência, efeito anti-hipertensivo pela diminuição da angiotensina II e aumento da bradicinina. Também pode influenciar a regulação de diferentes sistemas envolvidos na modulação da pressão arterial, como por exemplo, o sistema imunológico e o sistema nervoso (MEISEL, 1998, p. 11). Nakamura et al.(1995) relataram que peptídeos com resíduos dos aminoácidos Val-Pro-Ile-Pro-Ile-Pro-Pro, isolados de leite fermentado com *Lactobacillus helveticuse Saccharomyces cerevisiae*, exibiram forte ação inibidora da ACE e portanto a atividade anti-hipertensiva.

No que diz respeito à atividade antioxidante relacionada à proteína do leite, vários estudos já foram realizados. Timón et al. (2014) demonstraram que o queijo tipo Burgo produzido por diferentes tipos de coalho (vegetal, animal e microbiano) apresenta peptídeos com ação antioxidante, destacando que aquele fabricado com coalho vegetal apresentou maior proporção desses peptídeos. Os peptídeos antioxidantes presentes nos alimentos desempenham papel muito importante em relação ao sistema de defesa do organismo humano, uma vez que impedem a formação ou eliminam os radicais livres que provocam danos biomoleculares e causam câncer, envelhecimento, doenças do coração, dentre outros (GUPTA et al., 2009).

2.2 Peptídeos antimicrobianos

Em função do uso indiscriminado de antibióticos convencionais, muitos microrganismos desenvolveram resistência a medicamentos (THOMSON; BONOMO, 2005). Com isso, é grande o número de mortalidade e mobilidade de infecções em seres humanos relacionadas às bactérias, sejam Gram-positivas ou Gram-negativas (HSUEH; CHEN; LUH, 2005). Conseqüentemente é crescente o número de pesquisas envolvendo peptídeos naturais com atividade antibiótica, denominados de peptídeos antimicrobianos.

A disponibilidade de peptídeos antimicrobianos é importante para o sistema imunológico inato de defesa de animais e plantas, principalmente durante as etapas iniciais de infecção. De acordo com Papo e Shai (2003), existem mais de 700 peptídeos com ação antimicrobiana relatados em estudos, variando em sequência de aminoácidos, comprimento e estrutura.

Em geral, os modos de ação dos diversos peptídeos antimicrobianos envolvem a associação com lipídeos de membrana plasmática microbiana, promovendo o aumento de sua permeabilidade. Primeiramente, ocorre atração eletrostática entre as moléculas de peptídeos (que geralmente possuem carga positiva) e lipídeos aniônicos presentes na membrana bacteriana, iniciando a interação entre o peptídeo e a superfície bacteriana. Em seguida a estrutura anfipática dos peptídeos antimicrobianos desempenha seu papel, promovendo a interação destes peptídeos com a interface hidrofílica/hidrofóbica presente na superfície das biomembranas, causando conseqüentemente a ruptura da membrana microbiana, a entrada do peptídeo no seu interior, o extravasamento do conteúdo citoplasmático e finalmente a morte celular (NAGHMOUCHI; DRIDER; FLISS, 2007).

2.2.1 Peptídeos antimicrobianos derivados do leite

Em 1930, Jones e Simms relataram pela primeira vez as propriedades antimicrobianas *in vitro* do leite, quando observaram que o leite possuía inibidores ativos que retardavam o crescimento de bactérias estreptocócicas. Sabe-se que a atividade antimicrobiana do leite é atribuída principalmente a imunoglobulinas e proteínas não imunes, como a lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima (PAKKANEN; AALTO, 1997). Há cerca de 40 anos provou-se que as proteínas do leite também são precursoras de peptídeos com ação antimicrobiana, e, dessa forma, podem melhorar as defesas naturais do organismo contra a invasão de microrganismos patogênicos. Consequentemente, as proteínas do leite podem ser consideradas componentes nutricionais da imunidade (PELLEGRINI, 2003).

As caseínas são fontes de peptídeos antimicrobianos, pois existem relatos de fragmentos antimicrobianos derivados de α_{s1} -caseína (MCCAN et al., 2006), α_{s2} -caseína (LOPEZ-EXPOSITO et al., 2006), β -caseína (HAQUE; CHAND, 2008) e κ -caseína (CHENG et al., 2013). McCann et al. (2005) identificaram e isolaram quatro novos peptídeos com atividade antimicrobiana, correspondendo aos resíduos de aminoácidos 180-207, 175-207, 164-207 e 172-207, originados da digestão do caseinato de sódio bovino pela quimosina, todos eles originados do C-terminal da α_{s2} -caseína.

Em relação às proteínas solúveis, também existem relatados indicando a presença de peptídeos com atividade antibacteriana derivados da α - lactoalbumina (PELLEGRINI et al., 1999) e β - lactoglobulina (PELLEGRINI et al., 2001; THEÓLIER et al., 2013).

As caseínas são polipeptídeos de alta massa molecular que foram identificados após a hidrólise da caseína pela quimosina (LAHOV et al., 1971). Esses peptídeos apresentaram propriedades bactericidas contra várias bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (LAHOV; REGELSON, 1996).

Isracidina é um peptídeo com ação antimicrobiana originado da hidrólise da α_{s1} -caseína bovina por ação da quimosina, liberando o fragmento 1-23 (HILL; LAHOV; GIVOL, 1974). Em concentrações elevadas, a isracidina inibiu o crescimento *in vitro* de lactobacilos e outras bactérias Gram-positivas. No entanto, *in vivo*, a isracidina exerceu forte efeito protetor, em doses baixas contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* quando administrada em ratos (LAHOV; REGELSON, 1996). Em vacas diagnosticadas com mastite, a isracidina quando ministrada dentro dos níveis comparáveis ao tratamento-padrão com antibióticos, apresentou eficiência superior a 80% no tratamento da infecção crônica por estreptococos (HAQUE; CHAND, 2008).

O caseino macropeptídeo (CMP) corresponde ao fragmento de aminoácidos 106-169, derivado da hidrólise da κ -caseína sob ação da quimosina. A kappacina é um peptídeo contido no CMP f(138-158), representado por uma fração fosforilada e não glicosilada com ação antimicrobiana, que inibe o crescimento de *Streptococcus mutans*, *E. coli* e *Porphyromonas gingivalis* (MALKOSKI et al., 2001).

O CMP é encontrado no estômago, duodeno e jejuno dos seres humanos após a ingestão de leite (LEDOUX et al., 1999). A libertação de kappacina no estômago tem como objetivo minimizar a infecção do trato gastrointestinal do recém-nascido em desenvolvimento e aumentar a sensibilidade das bactérias ao ácido gástrico, eliminando o gradiente de cátions na transmembrana.

CHENG et al. (2013) avaliaram a presença de peptídeos antimicrobianos em leite de iaque, bovino de pelagem longa encontrado na China, após ação da tripsina. A hidrólise enzimática da κ -caseína desse leite resultou na liberação de peptídeos com potenciais efeitos antibacterianos sobre a *E. coli*, destacando que a hidrólise enzimática obtida após 4h demonstrou efeito antimicrobiano mais eficiente em comparação a outros períodos avaliados.

Casocidina-I foi o primeiro peptídeo antimicrobiano descrito derivado de α_{s2} -caseína (ZUCHT et al., 1995). É um fragmento que contém 39 resíduos de

aminoácidos f(150-188), sendo que 25% são aminoácidos básicos, altamente catiônicos, com ponto isoelétrico em torno de 10 e que apresenta ação contra *E. coli* e *S. carnosus*. Também, Recio e Visser (1999) observaram a existência de dois peptídeos com ação antibacteriana: fragmento I f(164-179), que faz parte da casocidina-I anteriormente identificada, e o fragmento II f (183-207). Ambos os fragmentos demonstraram uma importante atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Beta-caseína humana f(184-210) também deu origem a peptídeos antimicrobianos após a hidrólise pela proteinase de *Lactobacillus helveticus*. Esses peptídeos inibiram uma gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como por exemplo, bactérias potencialmente patogênicas como *Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* K12, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* (HAQUE; CHAND, 2008).

Pritchard, Phillips e Kailasapathy (2010) analisaram a presença de peptídeos antimicrobianos, antioxidantes e anti-hipertensivos em três marcas comerciais de queijos Cheddar australianos. Em relação à atividade antimicrobiana, observaram que os peptídeos solúveis extraídos do queijo apresentaram ação contra as bactérias *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus* sendo que os peptídeos maiores que 10kDa apresentaram maior poder de inibição para os dois primeiros microrganismos citados.

Silva (2012) afirmou que o queijo coalho fabricado na região nordeste do Brasil pode ser considerado alimento funcional, pois observou que os peptídeos bioativos presentes no produto podem ser classificados como antimicrobianos, carreadores de zinco e antioxidantes. Foi removido do queijo um extrato de peptídeos solúveis e a partir deste verificou-se a ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*). Assim, Silva (2012) considerou que a atividade antimicrobiana pode ser vantagem adicional durante o processo de produção, reduzindo possivelmente a contaminação

de alimentos lácteos e conseqüentemente proporcionando aumento da vida útil do produto.

2.3 Queijo artesanal do estado de Minas Gerais

Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil, com considerável produção de queijo artesanal, caracterizada principalmente pela presença de agricultura familiar. Em todo o Estado, existem cerca de 30 mil produtores de queijos artesanais. Desses, 10 mil são produtores das cinco principais regiões do Estado (Araxá, Canastra, Cerrado, Serro e Campo das Vertentes) (Figura 2), consideradas tradicionais e que produzem anualmente 29 mil toneladas de queijos, gerando mais de 26 mil empregos diretos (TEODORO et al., 2013).

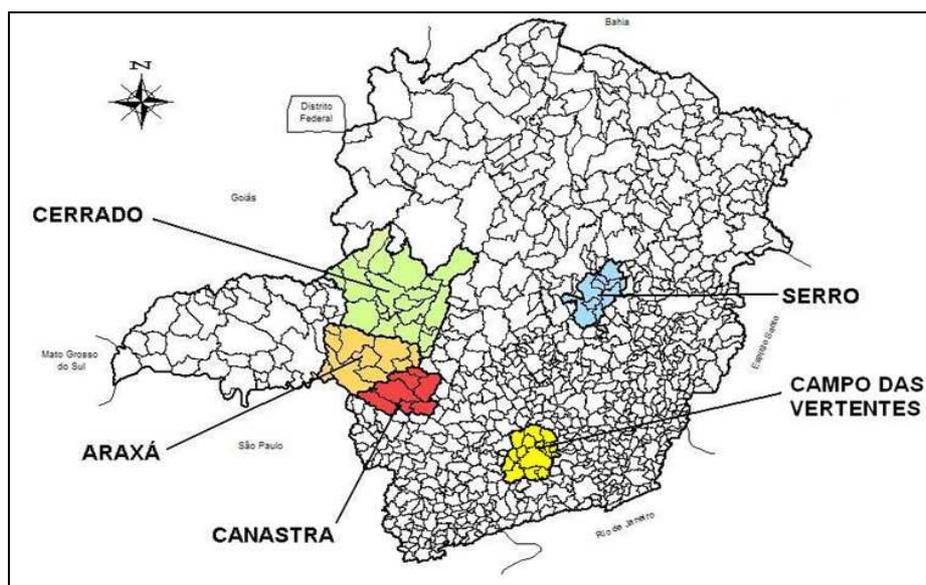


Figura 2 Mapa das principais regiões produtoras do queijo Minas artesanal
Fonte: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais - EMATER-MG (2014a)

A produção do queijo Minas artesanal iniciou-se no Brasil durante o período colonial. Foi em meados do século XVIII, com a mineração do ouro, que Portugal enviou ao país grande número de garimpeiros que tinham como

cultura a produção de queijos artesanais para o seu próprio consumo, muito semelhante ao queijo Serra da Estrela. Devido às condições ambientais mineiras como o clima, pastagem e relevo, além dos ingredientes como o coalho e os fermentos utilizados, o queijo artesanal mineiro diferiu muito em relação ao queijo português Serra da Estrela (BORELLI et al., 2006).

O governo de Minas Gerais, no intuito de ratificar a importância socioeconômica do queijo Minas artesanal, preservar as características históricas e culturais de cada região produtora e de proteger a caracterização do processo de produção do queijo, criou no ano de 2002 o “Programa Queijo Minas Artesanal” (MINAS GERAIS, 2002a, 2006). Esse programa tem como objetivo principal a garantia da qualidade do produto, além de assegurar aos pequenos produtores de leite mais uma alternativa para a comercialização do queijo, com maior valor agregado, gerando mais emprego e melhoria na qualidade de vida (EMATER-MG, 2014b).

A Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002b), que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal, definiu normas de fabricação, embalagem e transporte, estabelecendo ainda a obrigatoriedade do cadastramento oficial das queijarias e a certificação de qualidade dos produtores junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

De acordo com o Decreto nº 42.645 de 05 de junho de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a), que regulamenta o processo de produção do queijo Minas artesanal, o IMA certifica as condições higiênico-sanitárias necessárias para a produção do queijo artesanal, observando a execução das boas práticas de ordenha e fabricação. As queijarias certificadas resguardam o direito de comercializar o produto em todo o território nacional.

O Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008 (MINAS GERAIS, 2008) alterou alguns padrões microbiológicos e físico-químicos para o queijo Minas artesanal, estabelecidos pela Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (MINAS

GERAIS, 2002b). Na Tabela 3, observam-se as características microbiológicas e físico-químicas exigidas pela legislação vigente.

Tabela 3 Características microbiológicas e físico-químicas estabelecidas pelo Decreto n° 44.864/2008

Características Microbiológicas	Padrão*
Coliformes 30° C (NMP/g)	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5.000
Coliformes 45° C (NMP/g)	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500
Estafilococos coag. positivo (UFC/g)	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1.000
<i>Listeria</i> sp./25g	n = 5; c = 0; m = 0
<i>Salmonella</i> sp./25g	n = 5; c = 0; m = 0
Características Físico-químicas	Padrão
Umidade expressa em base úmida	Máximo 45,9%
Presença de amido	Negativo
Pesquisa de Fosfatase Alcalina	Positivo

* Plano de amostragem de 3 classes (n: número de amostras de um lote, c: número de aceitação, m: número mínimo de microrganismos, M: número máximo de microrganismos)

Fontes: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001) e Minas Gerais (2008)

O queijo Minas artesanal é aquele elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, com a adição de coalho extraído do bezerro, fermento e sal, sem nenhum tipo de aditivo e/ou coadjuvante de tecnologia e isento de técnicas industriais, devendo ser produzido, maturado e rotulado na propriedade beneficiadora.

O fermento, chamado de “pingo” pelos produtores, é endógeno, obtido pela coleta do soro dos queijos fabricados no dia anterior. O “pingo” contém espécies de bactérias lácticas que variam de acordo com a região mineira, desempenhando forte influência na glicólise, lipólise e proteólise do queijo e originando compostos responsáveis pelas características de sabor, aroma e textura (CABEZAS et al., 2007; LIMA et al., 2009; VILJOEN, 2001).

A maturação corresponde à fase de transformações físicas, químicas e biológicas, que ocorrem tanto na periferia como no interior da massa, por meio principalmente, da proteólise e a lipólise, que são significativamente responsáveis pela textura, sabor, composição química e qualidade final do

produto, sendo um fenômeno bastante complexo, variando de queijo para queijo (BEHMER, 1985; CARIDI et al., 2003; ECK, 1987). Além dessas alterações, o processo de maturação dos queijos pode contribuir significativamente com a redução de microrganismos patogênicos presentes nesse produto (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007).

A microbiota do queijo compreende dois grupos: microrganismos iniciadores e microrganismos secundários. A microbiota iniciadora é composta por bactérias lácticas que estão envolvidas no desenvolvimento da acidez durante a fabricação. A microbiota secundária tem papel significativo na fase de maturação do queijo (BERESFORD et al., 2001; GOBBETTI et al., 1999).

Após estudos técnico-científicos, o governo publicou a Portaria nº 1.305 de 30 de abril de 2013 (MINAS GERAIS, 2013), em que estabeleceu diretrizes para os queijos artesanais, definindo o período mínimo de dezessete dias de maturação para os queijos produzidos na microrregião do Serro e mínimo de vinte e dois dias para os queijos das microrregiões da Canastra, Campo das Vertentes, Cerrado e Araxá. Destaca-se que a maturação deve ser realizada à temperatura ambiente.

O queijo Minas artesanal deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprio, a massa uniforme com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região produtora (MINAS GERAIS, 2002b, 2011).

A comercialização de produtos alimentícios artesanais de forma segura e sustentável é um dos principais desafios encontrados pela agricultura familiar no Brasil. No que se refere a esse tipo de queijo, o ponto crucial é a utilização do leite cru, pois embora a maturação tenha a finalidade de redução de microrganismos patogênicos, o clima brasileiro e as condições envolvidas na produção do leite são extremamente favoráveis à contaminação e ao desenvolvimento desses microrganismos. A implementação das Boas Práticas

Agropecuárias (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) na produção de queijo artesanal é fundamental para a prevenção das contaminações.

2.3.1 Queijo Minas artesanal produzido na região da Canastra

Os primeiros habitantes da região da Canastra descendem dos índios Caiapós e Cataguases, além dos quilombos que foram numerosos por toda a região. Famílias originárias de São João Del Rei-MG, Barbacena-MG e do sul de Minas habitaram a Canastra em busca de diamantes e outras pedras preciosas, trazendo com elas o conhecimento da produção do queijo feito a partir do leite cru, encontrando na região o ambiente propício para a perpetuação dessa arte (ALMEIDA; FERNANDES, 2004).

A Canastra localiza-se na região sudoeste no estado de Minas Gerais. Suas coordenadas apontam para 47° 30' de longitude Oeste, 45° 30' de longitude Leste, 19° 45' a 20° 34' de latitude Sul. Privilegiada pela localização próxima a grandes centros consumidores, pela grande quantidade de água e pelo clima ameno, a região tem na agropecuária uma das principais fontes de riqueza (ALMEIDA; FERNANDES, 2004).

O clima é classificado como tropical de altitude, com média anual de 22,2°C, chuvas distribuídas entre os meses de outubro a março e índice pluviométrico médio em torno de 1.390 mm anuais. A umidade do ar é típica do cerrado, ou seja, inverno seco e verão úmido. O relevo, constituído de chapadões de altitude, permite o aparecimento de inúmeras nascentes e cachoeiras. A altitude da Canastra varia de 637 a 1.485 metros (ALMEIDA; FERNANDES, 2004). O rebanho da região é mestiço (*Bos taurus* e *Bos indicus*) com variações de cruzamentos (BRASIL, 2008). O queijo de Minas artesanal da Canastra só é produzido nessa região, onde combina, de maneira única, solo, pastagem, clima, estação do ano, altitude e água, influenciando de

forma direta na diversidade da microbiota endógena e conseqüentemente nas características do produto (RESENDE et al., 2011; SILVA et al., 2011).

A Portaria nº 694 de 17 de novembro de 2004 (MINAS GERAIS, 2004) identificou a microrregião da Canastra como produtora do queijo Minas artesanal, composta pelos municípios mineiros de Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita (Figura 3). Esses municípios apresentam quantidade significativa de pessoas no campo, sendo a maioria delas formadas por agricultores familiares que diversificam suas atividades e têm no queijo artesanal a sua fonte de renda principal (Tabela 4) (EMATER-MG, 2014c).

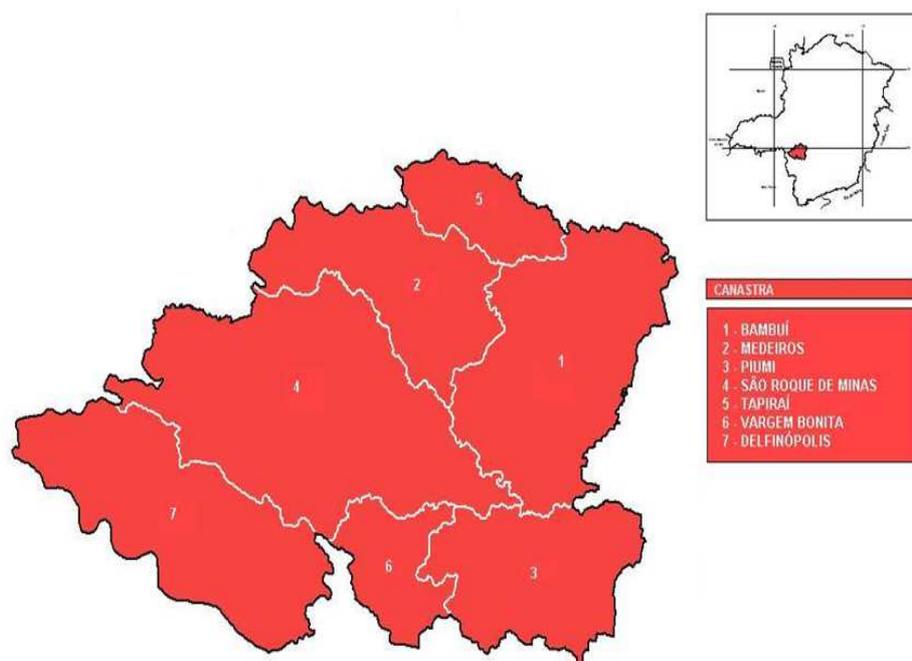


Figura 3 Mapa da microrregião da Canastra, produtora do queijo Minas artesanal
Fonte: Emater (2014c)

Tabela 4 Características gerais dos municípios produtores do queijo Minas artesanal Região da Canastra - 2004

MUNICÍPIO	ÁREA (km ²)	POPULAÇÃO (n)	POPULAÇÃO RURAL (%)
BambuÍ	1.457	21.682	18,5
Delfinópolis	1.171	6.572	29,0
Medeiros	969	3.038	51,6
Piumhi	905	28.757	12,3
São Roque de Minas	2.107	6.326	41,0
TapiraÍ	434	1.887	40,5
Vargem Bonita	409	2.206	46,6

Fonte: Almeida e Fernandes (2004)

De acordo com dados publicados em 2004 por Almeida e Fernandes, em “Caracterização da Microrregião da Canastra como Produtora do queijo Minas artesanal”, visto que não existem dados atuais, a microrregião da Canastra produziu anualmente na época em torno de 104 milhões de litros de leite, sendo que 50% deste foram utilizados para a produção de queijo. O queijo Minas artesanal da Canastra foi produzido por 1.795 produtores, com uma produção anual de 4.470 toneladas (Tabela 5), e grande parte dessa produção foi comercializada nos mercados de Belo Horizonte e São Paulo.

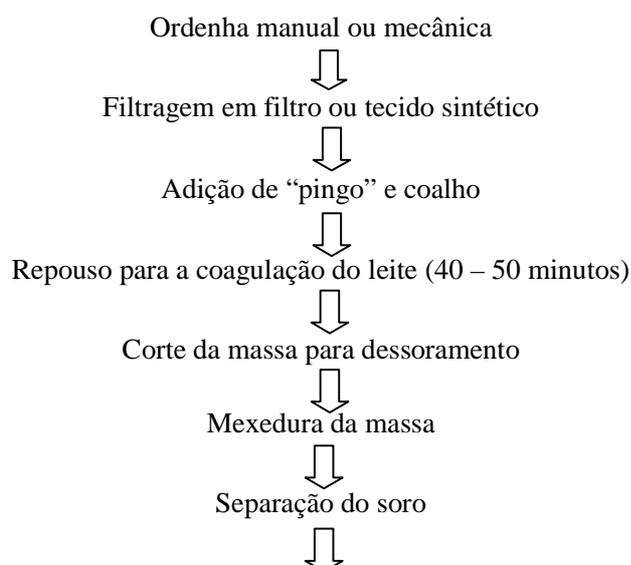
Tabela 5 Características rurais dos municípios produtores do queijo Minas artesanal da Canastra - 2004

Município	Propriedade rural (n°)	Pastagem (ha)	Rebanho (cabeças de bovinos)	Produção de leite (x 1.000 l)	Produtor de queijo (n°)	Queijo produzido por ano (ton)
BambuÍ	1.438	103.235,0	74.323	36.537	149	576
Delfinópolis	484	55.146,9	80.000	15.000	25	70
Medeiros	537	61.302,0	29.971	16.425	430	1.600
Piumhi	956	53.767,0	30.394	21.600	50	165
São Roque de Minas	933	45.000,0	18.811	7.560	852	1.537
TapiraÍ	258	31.900,0	18.320	4.438	89	162
Vargem Bonita	207	26.073,0	12.792	2.355	200	360
Total	4.813	376.423,0	264.611	103.915	1.795	4.470

Fonte: Almeida e Fernandes (2004)

Desde maio de 2008, o queijo Canastra é patrimônio cultural imaterial brasileiro, título concedido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) (BRASIL, 2008).

O processo de produção do queijo Minas artesanal da Canastra é composto por várias etapas (Figura4). O leite é obtido pela ordenha manual ou mecânica, em locais apropriados, cobertos ou não. Em seguida, o leite é filtrado com filtro ou tecido sintético devidamente higienizado. O “pingo” e o coalho são adicionados e espera-se, em média, de 40 a 50 minutos para a coagulação do leite. Decorrido esse tempo, a massa é cortada com uma pá ou régua e a mexedura é feita em pequenos intervalos para facilitar o dessoramento. Após a separação do soro, a massa é colocada em formas circulares, de 15 a 17 cm de diâmetro interno, revestida com tecido sintético e prensada manualmente com o auxílio desse tecido. Logo após, a massa enformada recebe sal grosso ou sal triturado na sua superfície. Depois de um período de seis a doze horas, o queijo é virado e o processo de salga é repetido. Após vinte e quatro horas, o queijo é retirado da forma, colocado em prateleiras de madeira, lavado e seco diariamente, durante sete a oito dias (MINAS GERAIS, 2014; ORNELAS, 2005, p. 65).



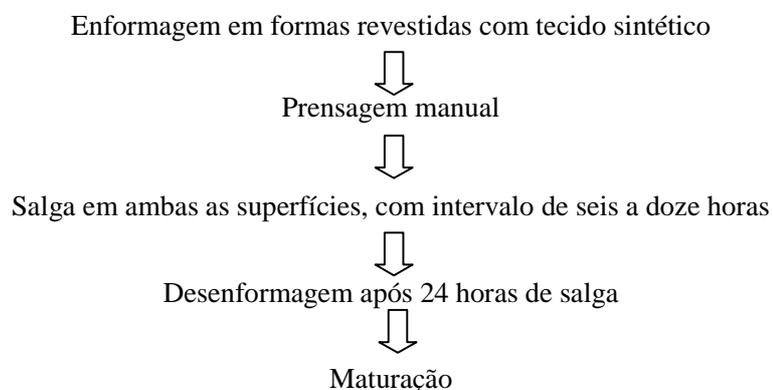


Figura 4 Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal da Canastra
Fonte: Almeida e Fernandes (2004)

O queijo Minas artesanal da Canastra deve apresentar como características físico-químicas e sensoriais: coloração branco-amarelada; textura compacta; consistência semidura com tendência à macia; crosta fina, amarelada e sem trinca; formato cilíndrico; altura de quatro a seis centímetros; diâmetro de quinze a dezessete centímetros; peso de aproximadamente um quilograma; sabor e odor ligeiramente ácido, não picante e agradável (ALMEIDA; FERNANDES, 2004).

Resende (2010), avaliando a influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias lácticas, identificou as seguintes bactérias no queijo artesanal da Canastra: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Weissellapara mesenteroides*, *Enterococcus* e *Lactococcus*. Esse autor sugeriu que esses gêneros de bactérias estão bem adaptados ao ambiente de produção, contribuindo para o desenvolvimento de características sensoriais do produto como sabor, aroma e textura.

Nóbrega (2007) avaliou amostras de “pingo” utilizado na fabricação do queijo da canastra no período das águas (PA) e no período de seca (PS). Obteve como resultado o isolamento e a identificação dos seguintes microrganismos:

bactérias do gênero *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, e leveduras das espécies *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbruekii*, *Candida zeylanoides*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia guilliermondii* e *Geotrichum capitatum*. No período da seca, foram identificados os mesmos microrganismos que no período das águas, porém em diferentes frequências e ainda acrescido das espécies de levedura *Pichia guilliermondii* e *Geotrichum capitatum*.

2.4 Processo de Maturação do queijo

A maturação corresponde ao conjunto de transformações físicas, químicas e biológicas, que incluem proteólise, lipólise e glicólise, que são significativamente responsáveis pela textura, sabor, composição química e qualidade final do produto, sendo fenômeno bastante complexo, variando de queijo para queijo (BEHMER, 1985; CARIDI et al., 2003; ECK, 1987).

Os principais componentes resultantes da maturação são aminoácidos, aminas, ácidos, tiois, tioésteres de proteínas, ácidos graxos, metilcetonas, lactonas, ésteres de lipídeos, ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, dióxido de carbono, ésteres e álcoois de lactose (FOX, 2003).

2.4.1 Proteólise

A proteólise consiste na degradação de proteínas pela ação de enzimas proteolíticas, dando origem a peptídeos de alta, média e baixa massa molecular, aminoácidos, aminas e amônias (FARKYE; FOX, 1990), que irão conferir sabor, aroma e textura característicos dos queijos. A procedência das enzimas proteolíticas pode ser do próprio leite, das bactérias que contaminam o leite, do coalho, das bactérias lácticas ou mesmo da microbiota secundária.

De acordo com Wolfschoon-Pombo e Lima (1989), o grau de proteólise pode ser medido por meio de índices denominados índice de extensão de maturação (IEM) e índice de profundidade de maturação (IPM).

O IEM é determinado pelo teor de substância nitrogenada acumulada na fase aquosa do queijo, podendo ser expresso por percentagem de nitrogênio total. É resultado da ação proteolítica das enzimas do coalho e da plasmina sobre a caseína, liberando peptídeos de alta massa molecular (WOLFSCHOON-POMBO; LIMA, 1989).

O IPM está relacionado com as substâncias nitrogenadas de baixa massa molecular, acumuladas durante o processo de maturação, principalmente por causa da ação de enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados provenientes da caseína, podendo ser expresso pelo teor de nitrogênio não proteico, medido pelo nitrogênio solúvel em TCA 12% (SILVA et al., 1995).

2.4.1.1 Enzimas responsáveis pelo processo de proteólise na maturação

As enzimas responsáveis pelo processo de maturação podem apresentar basicamente cinco origens: 1) enzimas naturais do leite, 2) enzimas do coalho, 3) enzimas de bactérias “*starter*”, 4) enzimas de bactérias “*starter*” secundárias, 5) enzimas de bactérias não “*starter*” (FOX et al., 1993).

A plasmina, protease de maior importância no leite, é uma serino-protease com o pH ótimo em torno de 7,5 e encontra-se em sua grande maioria associada à micela de caseína (FOX, 1993). Ela participa ativamente no processo de cura dos queijos, sendo a β -caseína a proteína mais sensível à sua ação, contribuindo para a produção de peptídeos de alta e média massa molecular originários da quebra da caseína, além da liberação de aminoácidos responsáveis pela textura do queijo (EARLY, 1998; PINHEIRO; MOSQUIM, 1991).

A principal enzima do coalho de origem animal é a quimosina, uma endopeptidase responsável por duas atividades. A primeira é a quebra da κ -

caseína especificamente na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆, formando os segmentos 1 – 105 (para-κ-caseína) e 106-169 (caseinomacropéptido); a segunda é a proteólise em geral, atuando sobre as proteínas e susceptível de atuar durante a cura dos queijos (ECK, 1987; SILVA et al., 1995).

As culturas “*starters*” presentes no fermento usado na produção de queijos são, em sua grande maioria, culturas lácticas responsáveis pela produção de ácido láctico, e conseqüentemente, pela queda do pH. Na maturação, as bactérias produtoras do ácido láctico (BAL) liberam dois tipos de enzimas: endopeptidases ou proteases, que hidrolisam as proteínas liberando peptídeos, e as exopeptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases), que quebram os peptídeos em aminoácidos (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001).

Em muitos queijos, as culturas “*starters*” secundárias são importantes na degradação das proteínas, sendo adicionadas como cultura adjunta ou estando presentes devido às características da região onde o queijo é produzido. São exemplos de culturas “*starters*” secundárias: *Brevibacterium linens*, bactérias propiônicas, fungos filamentosos (*Penicillium roqueforti* e *Penicillium candidum*) e leveduras (FOX et al., 1993).

As bactérias não “*starters*” são em maioria pertencentes aos gêneros *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*, geralmente encontrados em leite cru (FOX et al., 1993).

As bactérias psicotróficas, representadas principalmente pelos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Achromobacter* e *Alcaligenes* são encontradas em leite cru refrigerado sob condições higiênico-sanitárias precárias, liberando proteases termorresistentes que interferem diretamente no processo de fabricação dos queijos, inclusive na maturação (BRITO; DIAS, 1998). As proteases liberadas por esses gêneros são responsáveis por queda de rendimento nos queijos devido à quebra das proteínas, causando perdas de compostos nitrogenados para o soro (EARLY, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Laboratório de Pesquisa de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA/UFLA), no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCA/UFLA), nos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB/UFV) e do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOGRO/UFV), e no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol/UFV).

3.1 Queijo Minas artesanal da Canastra

As amostras do queijo Minas artesanal da Canastra foram coletadas diretamente de três produtores (A, B e C) cadastrados no Programa “Queijo Minas Artesanal” localizados na cidade de Medeiros-MG no período de setembro a novembro de 2014.

De cada produtor, foram adquiridos dois lotes de queijo Canastra, sendo que cada lote continha 5 unidades de queijos da mesma fabricação. Os lotes permaneceram nas propriedades rurais pelo período de até 30 dias, sendo coletada uma unidade de queijo a cada intervalo de tempo, de forma aleatória, para a realização das análises (Tabela 6). Para determinar o tempo de coleta de até trinta dias, considerou-se vinte e dois dias de maturação do queijo acrescido de oito dias para aquisição e consumo, acreditando que esse seria o tempo necessário para que o produto chegasse à mesa do consumidor e fosse consumido.

Tabela 6 Matriz de Experimentos

TEMPO DE COLETA (Dias)	QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA		
	(Unidade)		
	PRODUTOR A	PRODUTOR B	PRODUTOR C
02	1	1	1
09	1	1	1
16	1	1	1
23	1	1	1
30	1	1	1

Durante as coletas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificadas e transportadas em caminhão sob refrigeração, abaixo de 7°C, até o Laboratório de Pesquisa de Laticínio / Lavras - MG. Chegando ao laboratório, os queijos foram divididos ao meio, uma parte foi utilizada no mesmo dia para a execução das análises físico-químicas e a outra foi envolvida por papel laminado, congelada a -20°C e posteriormente encaminhada ao Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas/UFV/Viçosa – MG por meio de caixas isotérmicas com gelo, onde permaneceram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

Em todos os produtores, a coleta do segundo lote iniciou-se após a coleta do primeiro lote.

3.2 Análises físico-químicas

Foram realizadas em queijos Canastra com 2, 9, 16, 23 e 30 dias de maturação, pertencentes aos 3 produtores, as análises físico-químicas: Umidade, pH, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%, proteína total, extensão e profundidade de maturação

3.2.1 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade dos queijos foi utilizado o método de Umidade de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

3.2.2 Determinação do pH

Para a determinação do pH dos queijos foi utilizado o método potenciométrico, de acordo com a International Dairy Federation – IDF (1989).

3.2.3 Determinação do nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%

As análises de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12% dos queijos foram determinadas pelo método de Kjeldhal, de acordo com a técnica descrita pela International Dairy Federation - IDF (1982).

3.2.4 Determinação da proteína

A proteína total (PT) foi determinada pelo método de Kjeldhal, pela multiplicação do percentual de nitrogênio total (NT) pelo fator de correção 6,38, indicado para a proteína do leite, de acordo Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

$$PT (\%) = NT \times 6,38$$

3.2.5 Determinação da extensão de maturação

A extensão de maturação (EM) dos queijos foi quantificada indiretamente pela razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e a percentagem de NT, multiplicando o valor obtido por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983)

$$EM (\%) = \frac{NS \text{ pH } 4,6}{NT} \times 100$$

3.2.6 Determinação da profundidade de maturação

A profundidade de maturação (PM) dos queijos foi calculada de forma indireta por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) e a percentagem de NT, multiplicando o valor obtido por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$PM (\%) = \frac{NS\ TCA\ 12\%}{NT} \times 100$$

3.3 Extração de proteínas e peptídeos solúveis

Os extratos de proteínas e peptídeos solúveis foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Rizzello et al. (2005), com algumas modificações. Trinta gramas de queijo foram triturados em miniprocessador HC31 (Black & Decker, Brasil) por 1 minuto, adicionados 90mL de tampão fosfato de sódio 50mM (pH 7,0) e homogeneizado em homogeneizador tipo Stomacher MA440 (Marconi, Brasil) por 10 min. Em seguida, a suspensão foi mantida a 40°C por 1 h em banho-maria com o objetivo de liquefazer a gordura, posteriormente centrifugada a 3.000 x g por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, a camada superior de gordura foi rejeitada e o extrato solúvel foi filtrado através de papel filtro Whatman nº 2. O pH do filtrado foi ajustado para 4,6 usando HCl 1N, com a finalidade de precipitar a micela de caseína, e novamente centrifugado a 20.000 x g por 1 h. A caseína foi precipitada e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro Millex-HA com tamanho de poro de 0,22µm (Millipore Co, Bedford, MA).

3.4 Quantificação das proteínas e peptídeos solúveis nos extratos

A quantificação de proteínas e peptídeos solúveis nos extratos dos queijos foi determinada pelo método do Ácido Bicinonínico (BCA) (SMITH et al.,1985) usando o Kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (Sigma-Aldrich, Alemanha), ajustado para microensaio em placas de 96 poços, a 562 nm. A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão proteico na região de 2 a 24 µg. Cada poço da placa continha 3 µL de

amostra a ser avaliada, 22 μ L de água deionizada e 200 μ L do reagente de trabalho. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5 Separação cromatográfica dos extratos proteicos e peptídicos

Para cada queijo, volumes de extrato solúvel que continham 600 μ g de proteínas e peptídeos foram adicionados de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) até completar 330 μ L. A essa solução foram acrescentados 670 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) 0,15%, totalizando 1mL. Logo após, a solução final foi filtrada em filtro Millex-HA com tamanho de poro de 0,22 μ m (Millipore Co, Bedford, MA). Na preparação de 1mL de solução para separação em C18-RP-HPLC foi utilizado TFA 0,15% para que a concentração final de TFA nesta solução fosse igual a 0,1%, semelhante à da fase móvel.

A partir da injeção manual de 1mL da solução final, as proteínas e peptídeos foram separados por cromatografia de fase reversa em resina C18 (C18-RP-HPLC), utilizando uma coluna analítica (0,45 x 15 cm x 5,0 μ m) *Shim-pack* CLC-ODS (Shimadzu, Japão) em equipamento HPLC com detector UV operando a 214 nm (Water Corporation, Inglaterra). A coluna foi equilibrada com solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (solução A) e a eluição foi em gradiente crescente da solução TFA 0,1% e acetonitrila 80% (solução B). As frações eluídas do sistema de RP-HPLC foram coletadas com coletor automático (Water Corporation, Inglaterra) ao fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ durante 70 min, coletando 1 mL de eluato em cada fração. Para o branco, foi realizada uma corrida utilizando como amostra 330 μ L da solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) adicionado de 670 μ L de TFA 0,15% nas mesmas condições das amostras.

Esse método vem sendo utilizado para o isolamento de peptídeos bioativos a partir de matrizes alimentares complexas (GOMEZ-RUIZ; RAMOS; RECIO, 2002; RIZZELLO et al., 2005; TIMÓN et al., 2014).

3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas e peptídeos solúveis

Para a utilização das frações em ensaios antimicrobianos, a acetonitrila foi removida utilizando o equipamento Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf, Alemanha). Concentrou-se a amostra até o volume de 30 μ L e logo após foram feitas duas lavagens adicionando-se 90 μ L de água de osmose reversa e concentrando-se novamente até o volume final de aproximadamente 30 μ L. Por fim, foi adicionada água às frações, completando o volume para 750 μ L. Em seguida as frações foram filtradas por filtro Millex 0,45 μ m, estéril e descartável em câmara de fluxo laminar.

A ação antimicrobiana de proteínas e peptídeos solúveis foi avaliada sobre *E. coli* ATCC 25922 por ser microrganismo indicador das condições higiênico-sanitárias do queijo e por ser uma estirpe de referência recomendada para os testes de sensibilidade aos antibióticos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS,2010).

Com o objetivo de avaliar a presença de peptídeos antimicrobianos em queijo Canastra, foi realizado teste preliminar com queijos Canastra adquiridos no comércio de Lavras-MG, onde frações coletadas do RP-HPLC contendo proteínas e peptídeos solúveis foram avaliadas quanto à inibição de *E. coli* ATCC 25922 pela técnica de microdiluição em caldo utilizando o BHI. O resultado foi a presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos em frações variando o tempo de retenção entre 20 a 30 min (dados não apresentados).

3.6.1 Estocagem, preparo dos inóculos e padronização

Durante todo o experimento, as culturas estoque de *E. coli* ATCC 25922 foram mantidas em meio de congelamento (15 mL de glicerol; 0,5g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 100 mL de água destilada; pH $7,2 \pm 0,2$) e estocadas em freezer.

Anteriormente à execução das análises, a cultura estoque foi reativada pela transferência de alíquotas para tubos de ensaio contendo caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (Acumedia®, Lansing, Michigan, EUA), seguindo-se incubação a 37°C por 24 h.

Com o objetivo de padronizar o número de células viáveis a partir da cepa ativada, foram transferidos 200 µL para frascos Erlenmeyer contendo 150mL de BHI, que foram incubados a 37°C. A partir desse momento foram realizadas leituras periódicas da absorbância da cultura a 600 nm até a obtenção de aproximadamente 8 Log UFC/mL de acordo com a curva padrão. Em seguida foram feitas diluições seriadas em água peptonada 0,1 % (m/v) com posterior plaqueamento em superfície, utilizando-se o ágar BHI, e incubação a 37°C por 24 h.

3.6.2 Concentração mínima inibitória (MIC) de proteínas e peptídeos solúveis

Para determinação dos MICs de proteínas e peptídeos solúveis isolados em frações pertencentes à região com atividade antimicrobiana, de acordo com o teste preliminar, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo utilizando o BHI (NCCLS, 2010).

A fim de excluir a interferência do TFA sob as condições do ensaio antimicrobiano, foi realizado um pré-ensaio utilizando a técnica de microdiluição em caldo usando o BHI, em que o TFA 0,13% (v/v) (máxima concentração encontrada nas frações) substituiu as amostras eluídas das cromatografias. O resultado foi a completa inibição da *E. coli* quando comparado ao controle positivo (inóculo diluído em caldo BHI), uma vez que o meio de cultura apresentava pH abaixo de 3,0. No intuito de manter a solução dos poços das placas de ensaio antimicrobiano com pH neutro, o caldo BHI foi preparado utilizando tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), para evitar redução nos valores de pH do meio de cultivo. Em seguida foi refeito

o ensaio como descrito anteriormente. O resultado obtido foi o crescimento da *E. coli* semelhante ao controle positivo e a permanência do pH 7,0 da solução final contida nos poços.

Para os ensaios antimicrobianos foram adicionados inicialmente 100 µL de amostras e 200 µL de caldo BHI em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) em microplacas de poliestireno com 96 cavidades, fundo chato e tampadas, e em seguida foram realizadas diluições seriadas: 0,0; 1,0; 2,1; 4,2; 8,3; 16,7; 33,3%, totalizando o volume final de 150µl em cada poço. Logo após, 10 µL de BHI contendo inóculo bacteriano (10^8 UFC/mL) foram adicionados às cavidades. Para cada fração de proteínas e peptídeos, foram realizadas análises em triplicata. Em todas as concentrações, cavidades contendo apenas a fração de proteínas e peptídeos e meio de cultura (controle negativo) e cavidades contendo somente inóculo e meio de cultura (controle positivo) foram preparadas. Frações coletadas da corrida usando como amostra o tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) no HPLC seguiram a mesma metodologia.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. As absorvâncias das amostras foram lidas a 600 nm em leitor de microplacas Infinite® 200 PRO Nano Quant (Tecan, Suíça) antes do início da incubação (tempo zero) e após 24 h. Do valor de absorvância obtida a 24 h foi subtraída a leitura do tempo zero e as menores concentrações de proteínas e peptídeo solúveis que resultaram em completa inibição da *E. coli* foram denominadas MICs.

Para a avaliação da atividade bactericida das frações proteicas e peptídicas, com atividade inibitória, foi realizada a técnica de plaqueamento em microgotas, em que 10 µL das amostras contidas na microplaca, após a leitura da absorvância obtida às 24 h, foram adicionadas às placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas a 37°C por 24 h (SILVA et al., 2007). O não

crescimento do microrganismo remete à ação bactericida de proteínas e peptídeos solúveis.

3.7 Quantificação de proteínas e peptídeos solúveis presentes nas frações

A quantificação de proteínas e peptídeos solúveis das frações que apresentaram ação inibitória sob a *E. coli* foram determinadas usando o equipamento Nano Drop Lite Spectro photometer (Thermo Cientific, U.S.A.). Foram avaliados 1µL de amostras e a concentração foi obtida a 280 nm. Água destilada foi utilizada como branco e a BSA foi utilizada como padrão proteico. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.8 Identificação dos peptídeos solúveis presentes nas frações

As frações que apresentaram ação antimicrobiana foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF em equipamento Ultraflex III (Bruker Daltonics). A cada fração, foi adicionada a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico ($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em acetonitrila 50% e TFA 0,1%) na proporção de 1:1 (1,5µL de amostra:1,5 µL de matriz). Em seguida, a mistura foi adicionada à placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics). Foi utilizado o padrão Pepti de Calibration Standard II (BioRad, Alemanha). O método de análise para MS1 foi RP PepMix (560 a 3.400 Da), no modo de detecção linear com íons positivos, e o método de análise para MS2 foi o Lift Positivo, que corresponde à fragmentação dos peptídeos eluídos.

Os espectros obtidos da análise de MS2 no MALDI-TOF/TOF foram editados utilizando o software *FlexAnalysis* 3.3 (Bruker Daltonics) e salvos como arquivos de *peaklist* em extensão.mgf. Posteriormente, esses espectros foram submetidos ao método Snap Full Process Calibrate Statical– SFPC e os dados de cada *spot* foram unidos por combinação arbitrária de *lifts* em um único arquivo usando o programa BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

A identificação dos peptídeos foi realizada com o programa MASCOT DAEMON (Matrix Science, Inglaterra) com os seguintes parâmetros: grupo taxonômico “outros mamíferos”, nenhuma clivagem por enzima, variação de massa dos peptídeos de no máximo 0,5 Da, não permitindo nenhuma clivagem perdida, carga do peptídeo +1 e instrumentação MALDI-TOF/TOF. O banco de dados UniProt (<http://www.UniProt.org/>) foi utilizado para a busca de peptídeos homólogos aos encontrados no gênero *Bos*. Em seguida, foi realizado um alinhamento de sequências utilizando o programa Clustal Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (LARKIN et al., 2007). Para a validação dos resultados obtidos no MASCOT DAEMON foi aplicado pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.0 (Proteome Software, EUA) com número mínimo de peptídeos igual a 1 e mínimo de 90% e 80% de homologia para proteínas e peptídeos, respectivamente.

3.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com duas repetições. As análises descritivas com médias relacionadas às análises físico-químicas dos queijos Canastra foram realizadas pelo software SISVAR. Em seguida, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Scott-Knott, para a identificação das diferenças, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais da Canastra

Os valores médios de umidade, pH, proteína total, extensão e profundidade de maturação do queijo ao longo de 30 dias de maturação estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 Valores médios* de pH, umidade, proteína total, extensão e profundidade de maturação do queijo Canastra ao longo de 30 dias de maturação

		pH				
		02	09	16	23	30
Tempo (dias)	Produtor					
	A	4,74 ± (0,020) a**	4,74 ± (0,108) a	4,74 ± (0,010) a	4,73 ± (0,214) a	4,98 ± (0,077) b
	B	4,81 ± (0,005) a	4,93 ± (0,015) b	4,95 ± (0,012) b	4,94 ± (0,023) b	5,09 ± (0,083) c
	C	4,86 ± (0,055) b	4,92 ± (0,024) b	4,88 ± (0,093) b	4,95 ± (0,061) b	5,07 ± (0,094) c

***C.V.(%): 1,64; Scott Knott a 5%

		Umidade (%)				
		02	09	16	23	30
Tempo (dias)	Produtor					
	A	53,33 ± (8,016) d	37,52 ± (1,796) b	31,82 ± (0,045) a	28,76 ± (1,798) a	27,30 ± (1,450) a
	B	44,99 ± (7,929) c	35,64 ± (0,382) b	31,67 ± (2,060) a	29,03 ± (0,785) a	27,32 ± (2,242) a
	C	56,26 ± (2,270) d	41,96 ± (13,612) c	38,50 ± (2,418) b	29,27 ± (0,148) a	29,33 ± (1,486) a

C.V.(%): 10,86; Scott Knott a 5%

		Proteína Total por Kjeldhal (%)				
		02	09	16	23	30
Tempo (dias)	Produtor					
	A	20,21 ± (2,276) b	21,19 ± (0,391) c	21,76 ± (0,082) c	21,71 ± (0,341) c	21,95 ± (0,766) c
	B	18,21 ± (0,302) a	22,56 ± (0,105) c	22,28 ± (0,086) c	23,22 ± (0,080) c	25,68 ± (4,002) d
	C	21,59 ± (0,640) c	21,59 ± (0,093) c	24,61 ± (3,877) d	25,41 ± (2,440) d	25,43 ± (0,096) d

C.V.(%): 7,59; Scott Knott a 5%

Continuação...					
Extensão da Maturação (%)					
Tempo (dias)	02	09	16	23	30
Produtor					
A	18,43 ± (2,697) a	21,67 ± (1,415) b	19,15 ± (1,523) b	20,89 ± (3,812) b	26,92 ± (8,912) c
B	14,45 ± (0,990) a	23,20 ± (3,392) b	20,81 ± (2,354) b	23,12 ± (4,845) b	32,23 ± (0,409) c
C	16,34 ± (5,086) a	16,17 ± (1,470) a	15,52 ± (0,815) a	21,42 ± (6,491) b	29,07 ± (0,563) c
C.V.(%): 17,92; Scott Knott a 5%					
Profundidade da Maturação (%)					
Tempo (dias)	02	09	16	23	30
Produtor					
A	14,01 ± (2,440) a	13,54 ± (4,715) a	15,37 ± (0,730) a	16,32 ± (1,940) b	21,29 ± (1,268) c
B	13,72 ± (0,782) a	17,52 ± (6,103) b	16,74 ± (3,492) b	16,79 ± (3,016) b	20,88 ± (0,375) c
C	11,47 ± (1,707) a	13,94 ± (1,268) a	13,21 ± (0,515) a	15,88 ± (1,654) b	17,04 ± (0,462) b
C.V.(%): 16,32; Scott Knott a 5%					

*Valores médios das análises físico-químicas são referentes a 2 lotes, sendo coletado 1 queijo para cada dia por produtor.

**Valores médios das análises físico-químicas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ($p > 0.05$).

***C.V.: Coeficiente de Variação.

Os queijos Minas artesanais da Canastra apresentaram resultados semelhantes em todas as análises físico-químicas, ao longo da maturação. Os queijos apresentaram aumento nos valores médios de pH especialmente ao final da maturação. Segundo Dores (2007), esse acréscimo do pH está relacionado à degradação proteica e à formação de compostos nitrogenados alcalinos, por ação de proteases naturais do leite e daquelas presentes no coalho e no “pingo”. A desaminação que ocorre na proteólise, a descarboxilação de aminoácidos e a dissociação de ácidos são fatores que contribuem para o aumento dos valores de pH.

O Decreto Estadual nº 44.864/2008 especifica um valor máximo de 45,9 % de umidade para queijos artesanais após o período de 22 dias de maturação. De

acordo com os resultados obtidos neste trabalho, todos os queijos estavam dentro dos padrões, sendo classificados como queijos de baixa umidade.

Os valores médios de concentração de proteína total apresentaram aumento ao longo do período de maturação. Esse acréscimo, segundo Silva (2007), pode estar relacionado à perda de umidade do queijo durante o período de maturação que, conseqüentemente, aumenta a concentração dos sólidos totais.

Os percentuais de extensão de maturação e de profundidade de maturação apresentaram os maiores valores de coeficiente de variação, sendo 17,92 % e 16,32 %, respectivamente. De acordo com Silva (2007), esses resultados podem ser explicados pela falta de padronização do processo de fabricação, como por exemplo, as variações nas espécies e concentrações da microbiota endógena presente no “pingo”, quantidades indiscriminadas de “pingo” e coalho adicionados ao leite, além da variação da quantidade de sal acrescentado ao queijo e do seu tempo de permanência na etapa de salga. Os valores médios de extensão e profundidade de maturação nos queijos com trinta dias de maturação foram mais altos do que os queijos analisados com dois de maturação. Early (1998) explicou que a temperatura ambiente favorece a proteólise primária, representada pela extensão da maturação, sendo formada pela quebra da caseína em peptídeos maiores devido principalmente à ação de resíduos dos agentes coagulantes sobre a α_{s1} -caseína e a β -caseína. Segundo Grappin e Beuvier (1998), a profundidade de maturação varia principalmente em função da ação de enzimas microbianas e amino peptidases presentes naturalmente no leite, uma vez que a temperatura influencia diretamente no desenvolvimento microbiano e na produção de suas enzimas.

4.2 Concentração de proteínas e peptídeos solúveis no extrato

Na Tabela 8 estão representadas as concentrações médias de proteínas e peptídeos solúveis extraídos nos queijos Canastra.

Tabela 8 Concentração média* de proteínas e peptídeos solúveis extraídos do queijo Canastra ao longo de 30 dias de maturação

		Proteínas e Peptídeos Solúveis pelo BCA (μg de proteínas e peptídeos solúveis/ μL de solução)				
Tempo (dias)	Produtor	02	09	16	23	30
A		2,05	2,41	3,07	2,64	2,66
		$\pm (0,311)$ a**	$\pm (0,544)$ a	$\pm (1,492)$ a	$\pm (0,658)$ a	$\pm (0,537)$ a
B		3,14	3,61	4,43	4,28	5,08
		$\pm (0,267)$ a	$\pm (0,608)$ a	$\pm (0,735)$ b	$\pm (0,813)$ b	$\pm (0,276)$ b
C		2,96	3,61	4,26	4,26	5,13
		$\pm (0,226)$ a	$\pm (1,004)$ a	$\pm (0,000)$ b	$\pm (0,530)$ b	$\pm (0,064)$ b

C.V.(%): 18,14; Scott Knott a 5%

*Concentração média de proteínas e peptídeos solúveis são referentes a 2 lotes, sendo coletado 1 queijo para cada dia por produtor.

**Concentrações médias de proteínas e peptídeos solúveis seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ($p > 0.05$).

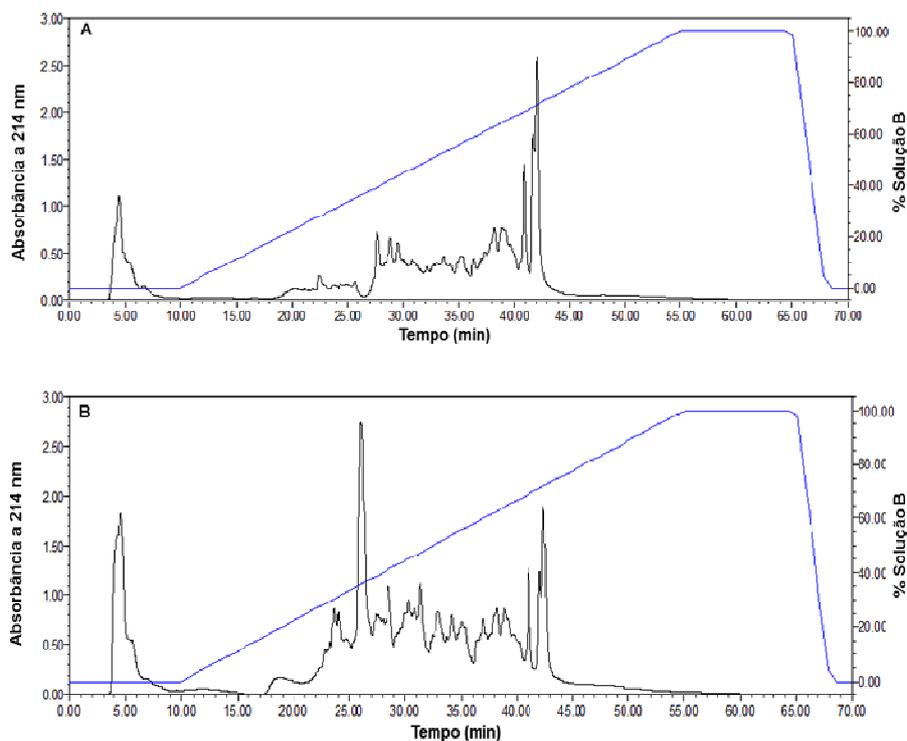
***C.V.: Coeficiente de Variação.

Em todos os queijos Canastras, os valores médios da concentração de proteínas e peptídeos solúveis aumentaram ao longo da maturação. Essa tendência foi verificada por Lignitto et al. (2010) que observaram a variação de $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a $22,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de peptídeos solúveis em queijo Asiago d'allevo ao longo de 6 meses de maturação. Essa tendência está relacionada principalmente a fatores como: diminuição da percentagem de umidade no queijo à medida que este fica exposto à temperatura ambiente durante o período da maturação e aumento gradual da degradação das caseínas, liberando peptídeos solúveis expressos pela percentagem da extensão e profundidade de maturação (DORES, 2007).

4.3 Perfil cromatográfico dos extratos proteicos e peptídicos

Extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra apresentaram diversos picos foram eluídos entre 20 e 70% (v/v) de solução B, equivalentes a 16 e 56% (v/v) de acetonitrila.

As Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 apresentam os cromatogramas de separação dos extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos - Minas artesanal da Canastra - produzidos pelos produtores A, B e C. Inicialmente as moléculas proteicas apresentaram em sua grande maioria caráter hidrofóbico quando observada a faixa de eluição do gradiente de acetonitrila. Ao longo da maturação a ação proteolítica nos queijos deu origem a peptídeos com características parcialmente hidrofóbicas. Os perfis das moléculas proteicas e peptídicas solúveis obtidos pelos queijos dos produtores estudados neste trabalho foram semelhantes.



Continuação...

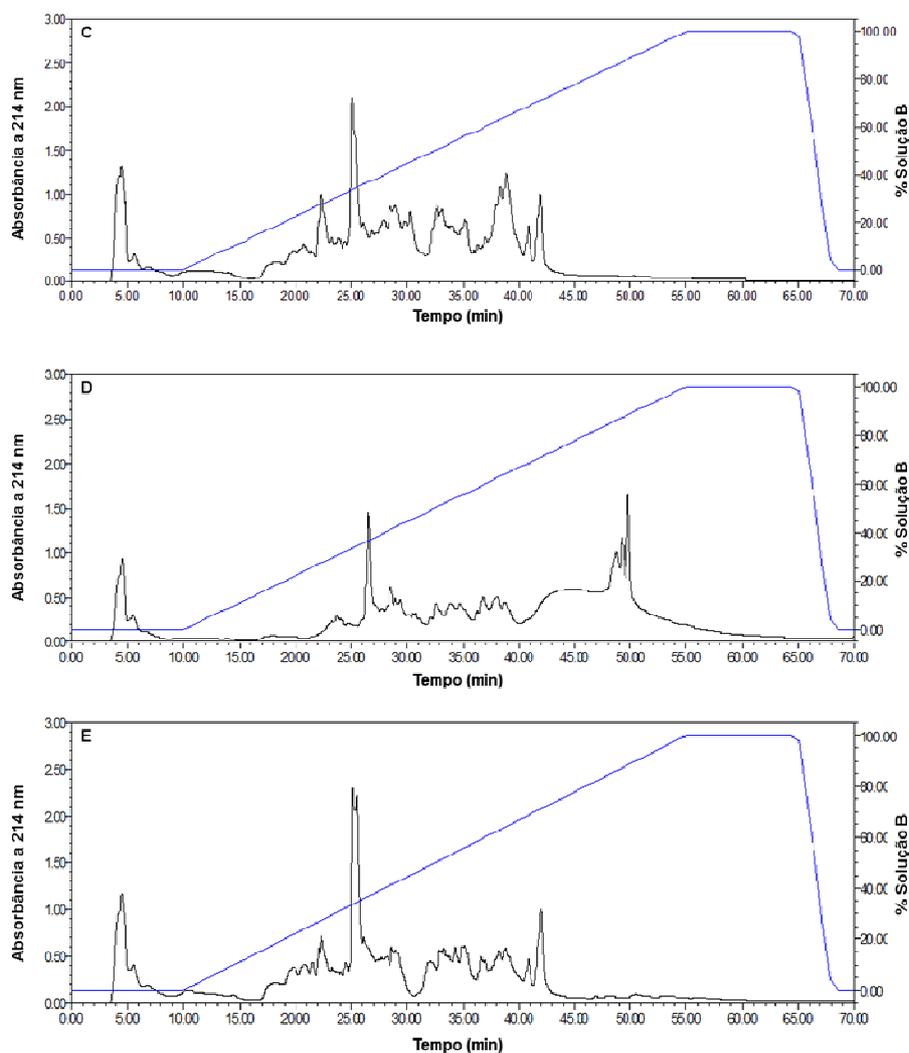
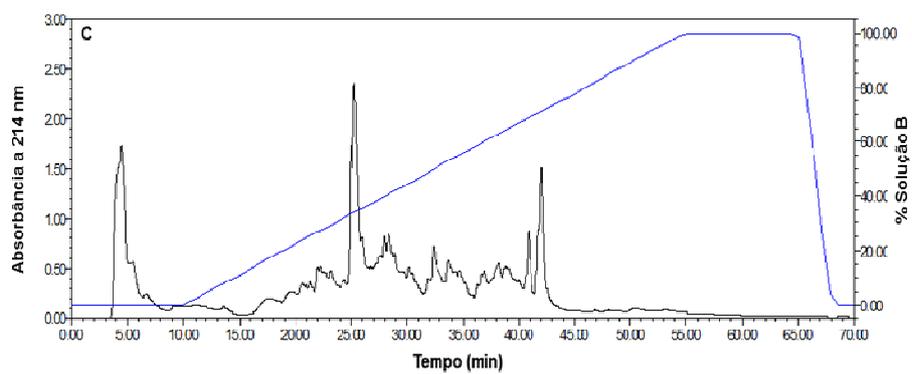
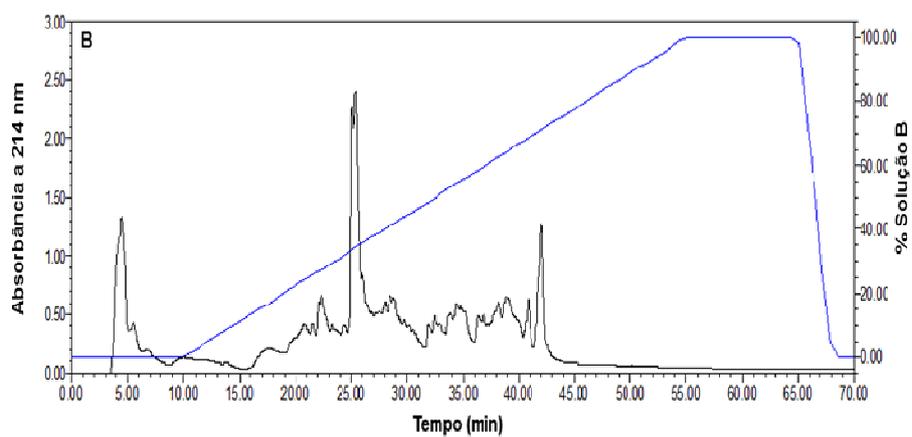
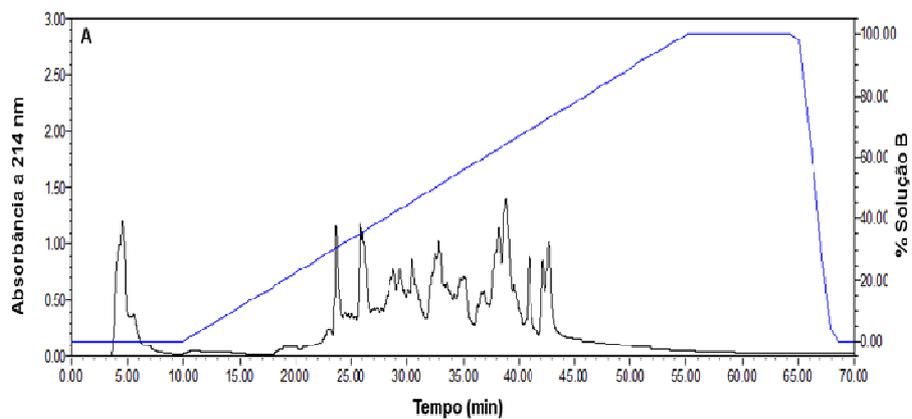


Figura 5 Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor A (Lote 01) O tempo de maturação dos queijos avaliados foi de: A) 2 dia, B) 9 dias, C) 16 dias, D) 23 dias e E) 30 dias. A coluna foi equilibrada em solvente A e as proteínas e peptídeos eluídos em gradiente contínuo crescente de acetonitrila (linha contínua), a um fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v).



Continuação...

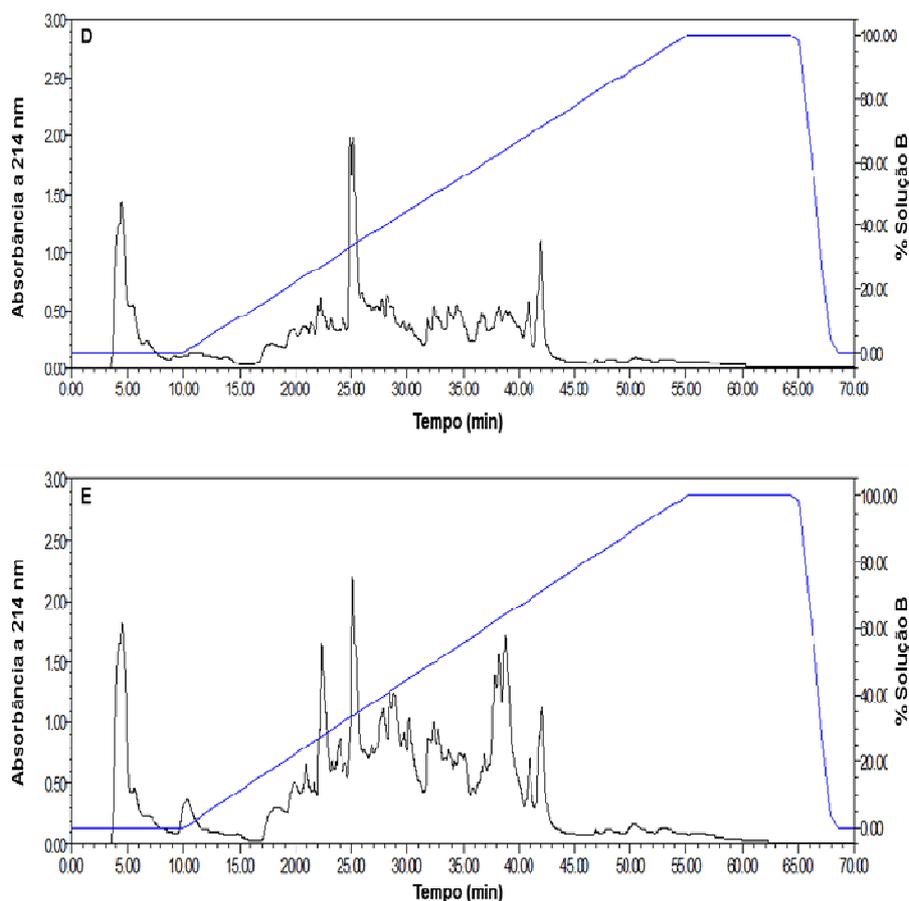
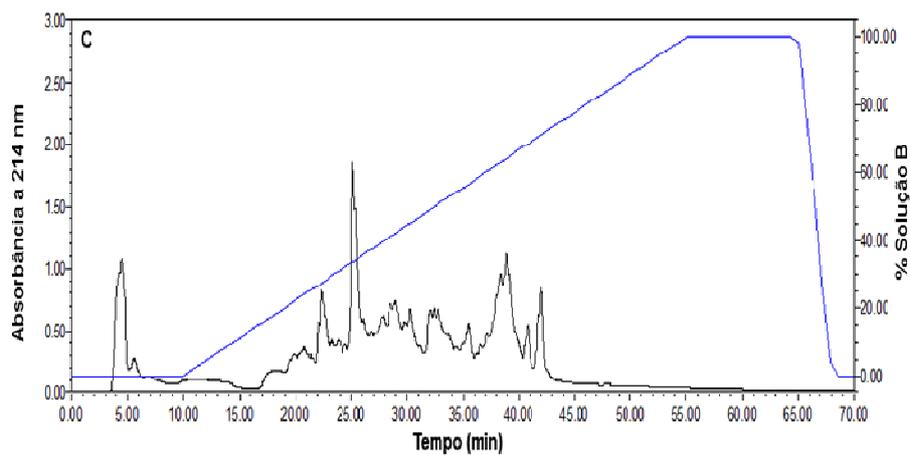
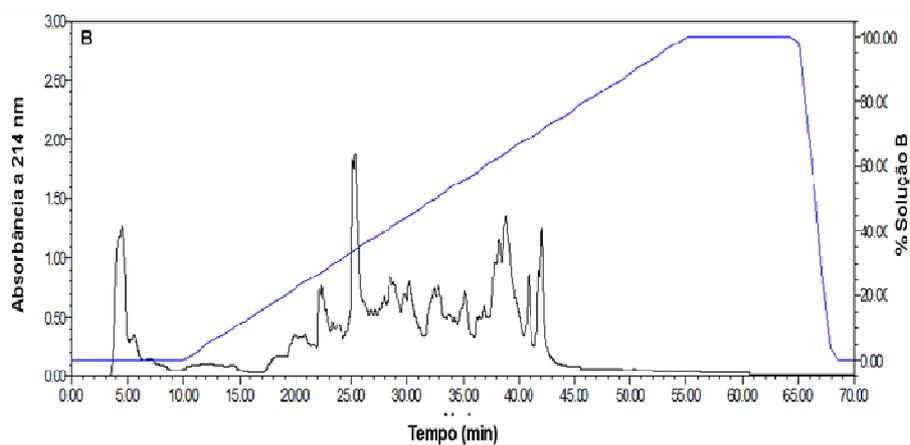
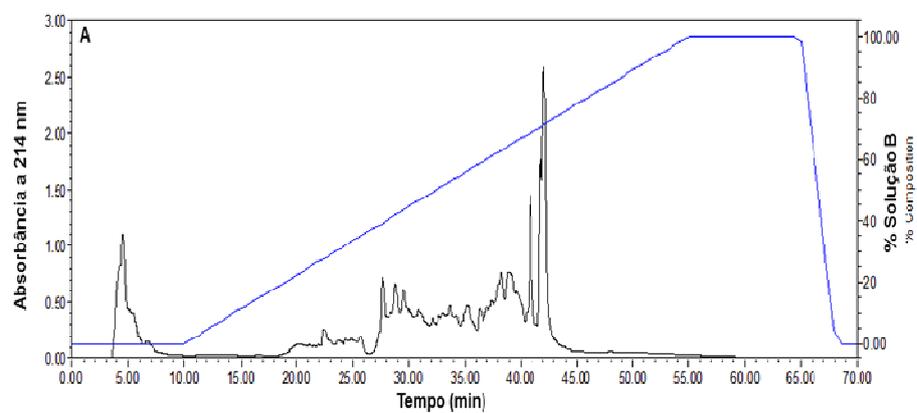


Figura 6 Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos protéicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor A (Lote 02) O tempo de maturação dos queijos avaliados foi de: A) 2 dia, B) 9 dias, C) 16 dias, D) 23 dias e E) 30 dias. A coluna foi equilibrada em solvente A e as proteínas e peptídeos eluídos em gradiente contínuo crescente de acetonitrila (linha contínua), a um fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v)



Continuação...

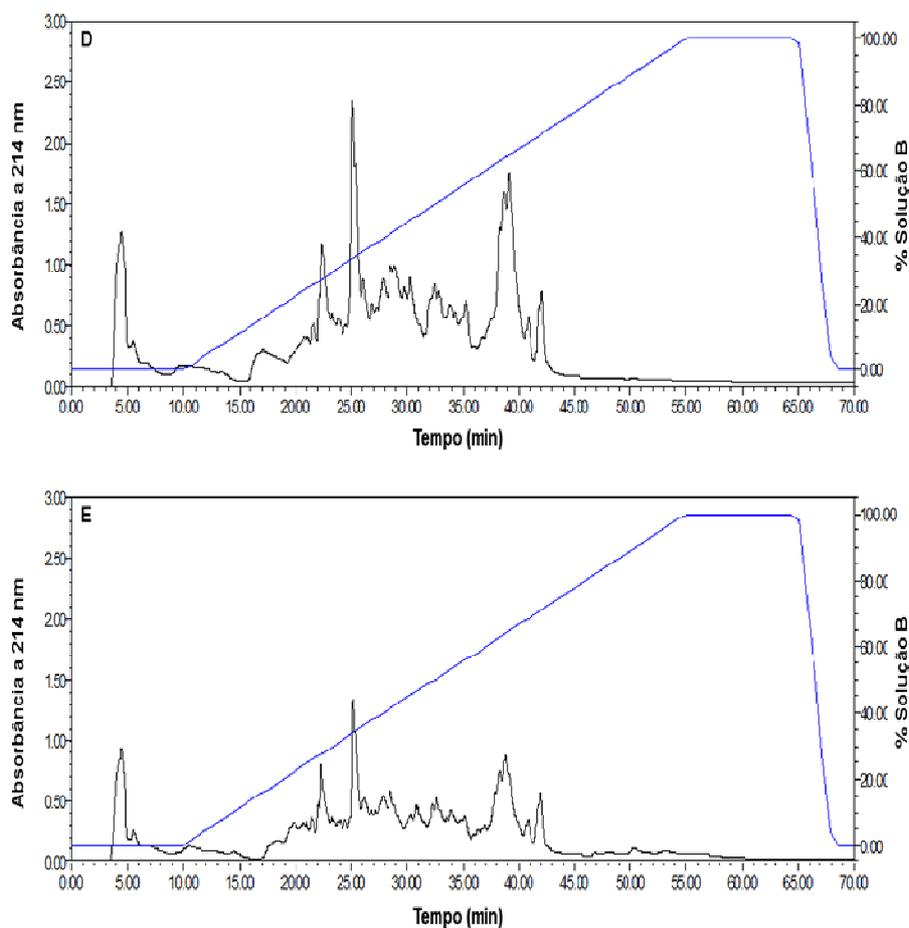
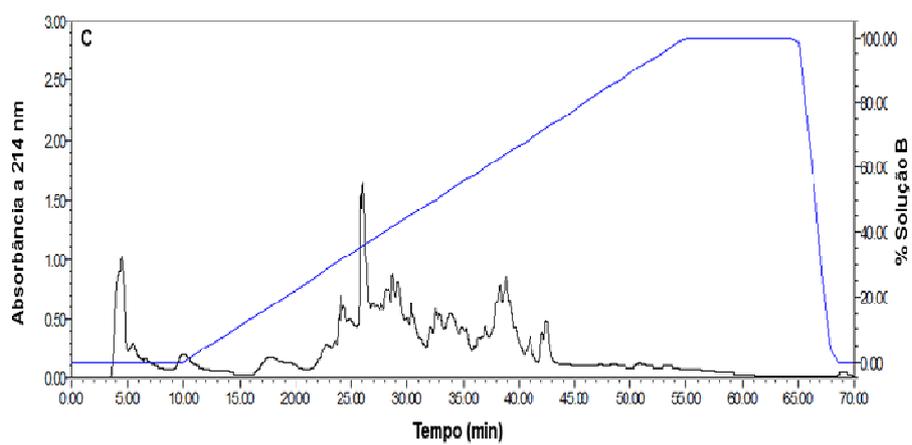
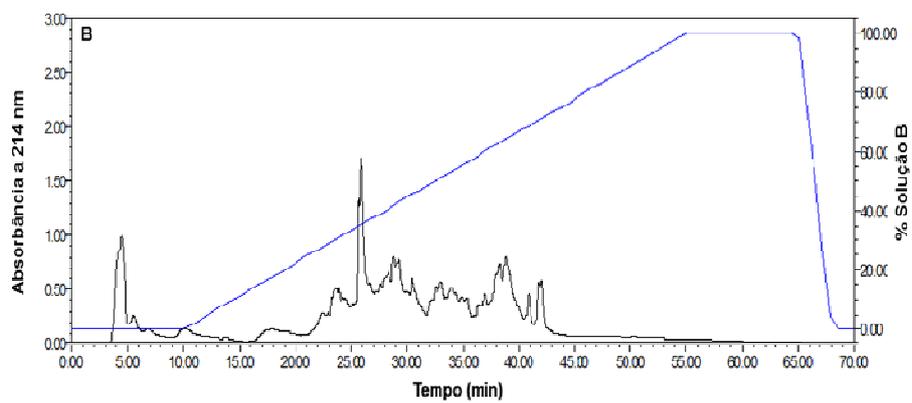
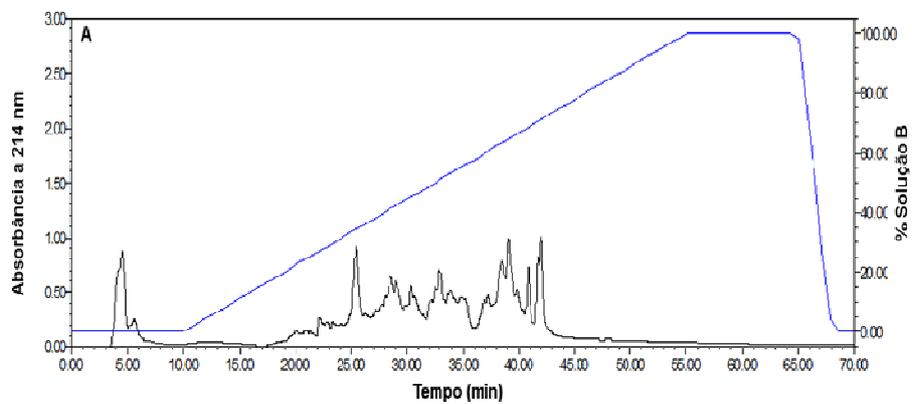


Figura 7 Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados produtor B (Lote 01) O tempo de maturação dos queijos avaliados foi de: A) 2 dia, B) 9 dias, C) 16 dias, D) 23 dias e E) 30 dias. A coluna foi equilibrada em solvente A e as proteínas e peptídeos eluídos em gradiente contínuo crescente de acetonitrila (linha contínua), a um fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v)



Continuação...

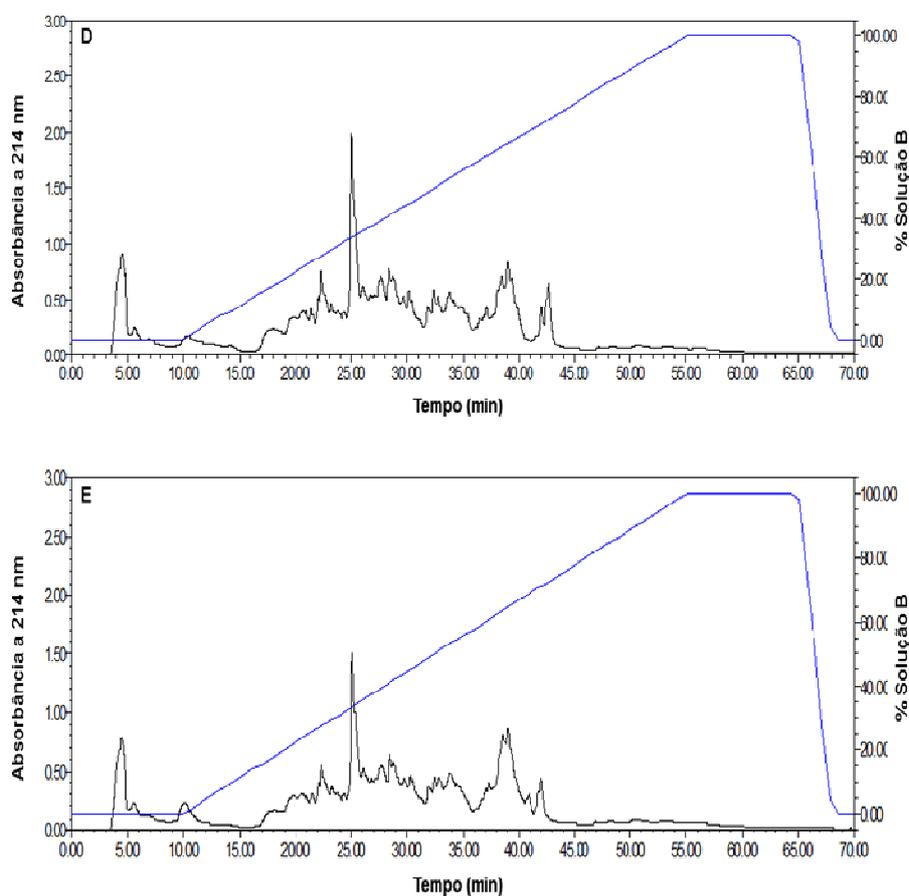
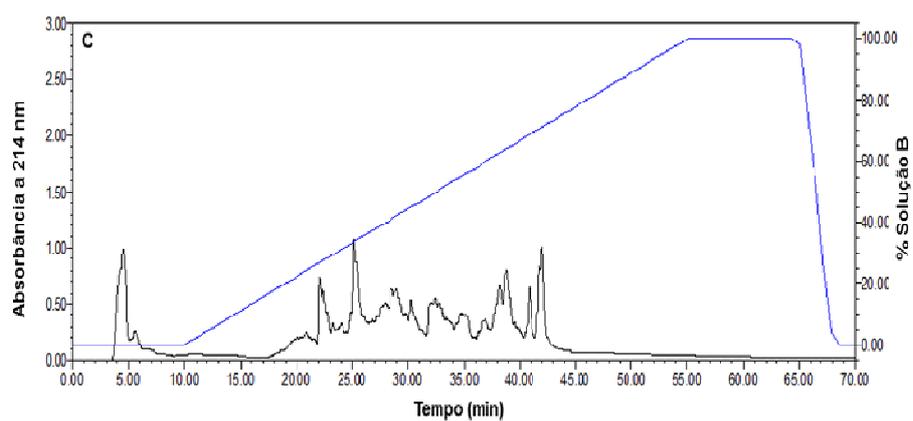
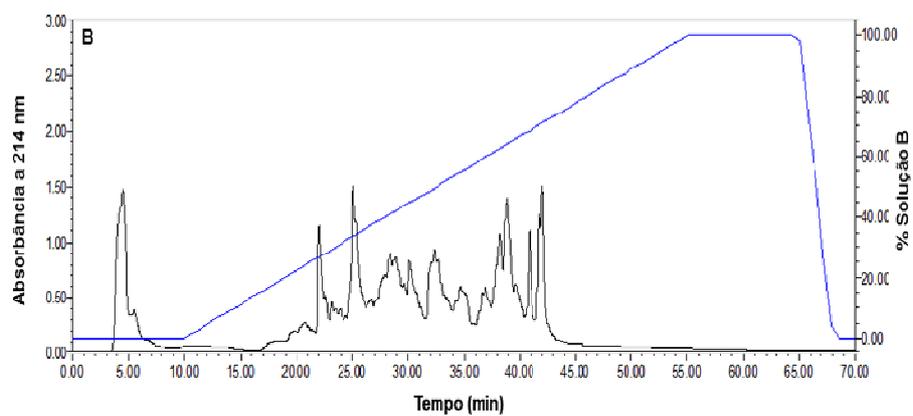
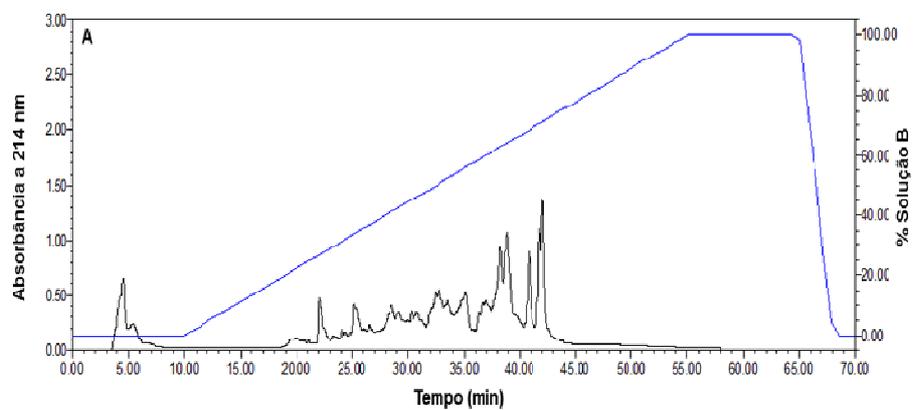


Figura 8 Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor B (Lote 02). O tempo de maturação dos queijos avaliados foi de: A) 2 dias, B) 9 dias, C) 16 dias, D) 23 dias e E) 30 dias. A coluna foi equilibrada em solvente A e as proteínas e peptídeos eluídos em gradiente contínuo crescente de acetonitrila (linha contínua), a um fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v)



Continuação...

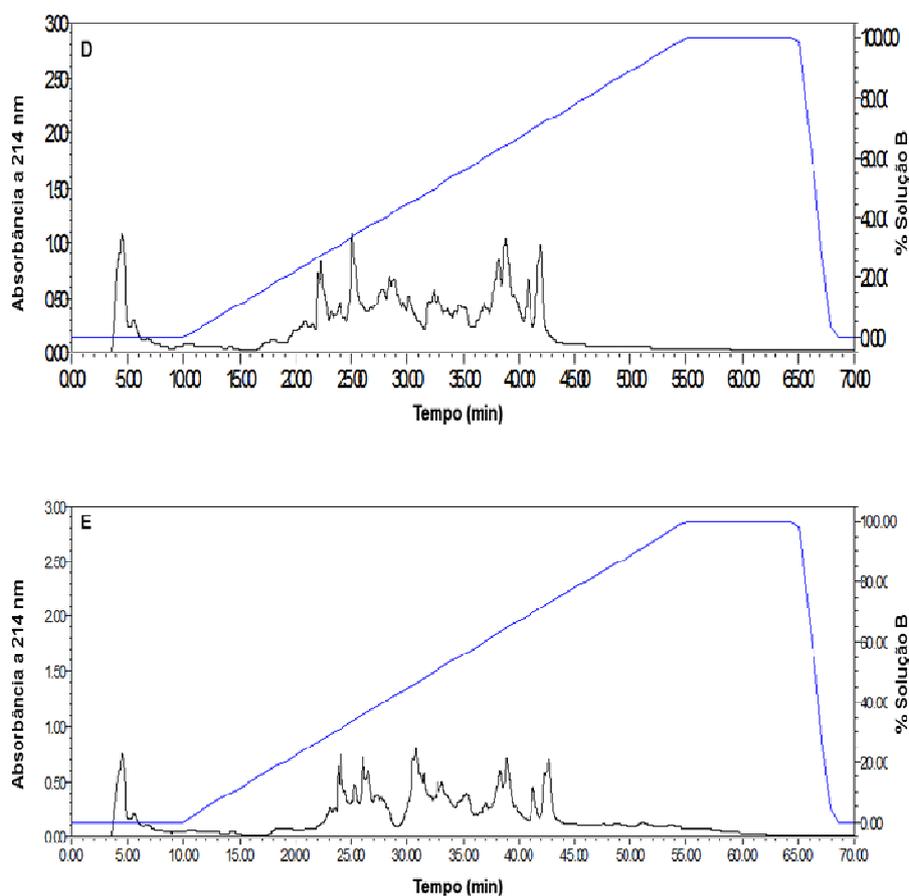
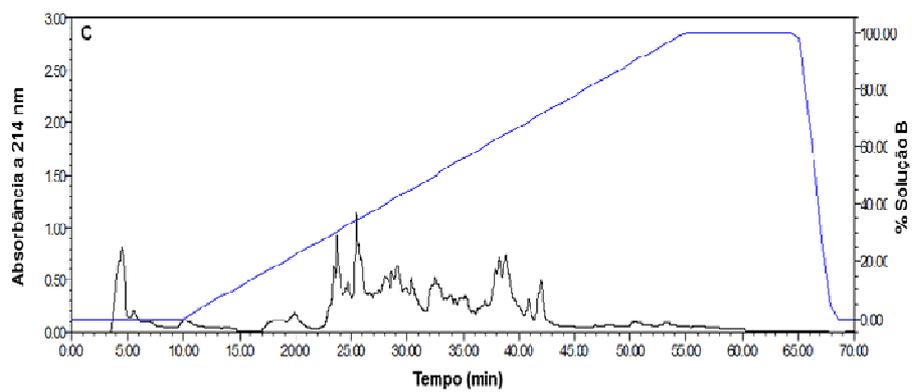
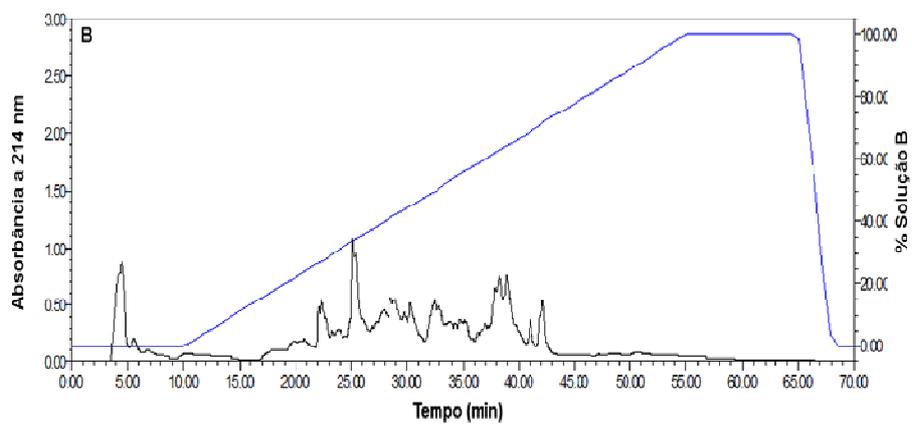
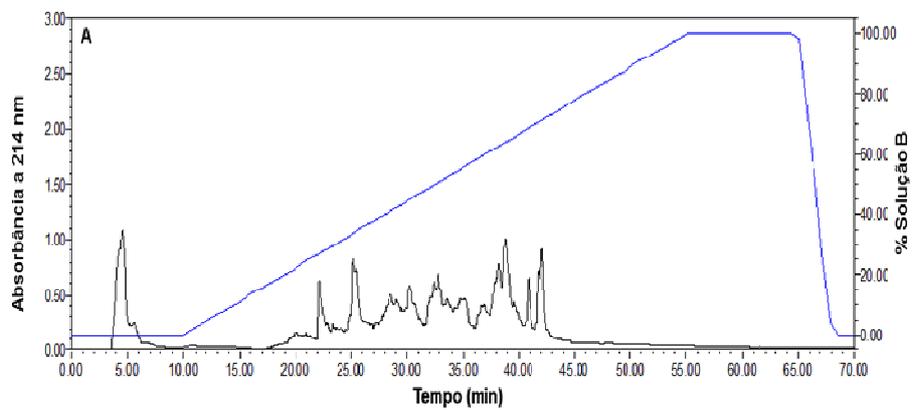


Figura 9 Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor C (Lote 01) O tempo de maturação dos queijos avaliados foi de: A) 2 dia, B) 9 dias, C) 16 dias, D) 23 dias e E) 30 dias. A coluna foi equilibrada em solvente A e as proteínas e peptídeos eluídos em gradiente contínuo crescente de acetonitrila (linha contínua), a um fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v)



Continuação...

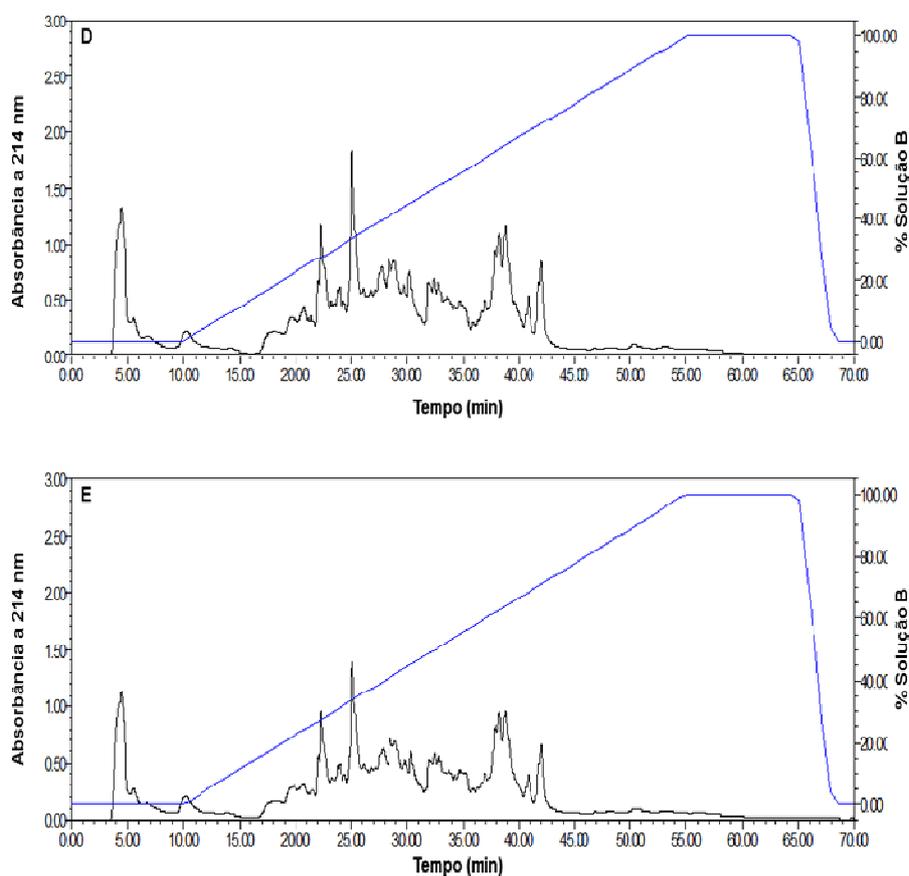


Figura 10 Perfis das cromatografias líquidas de fase reversa de extratos proteicos e peptídicos solúveis dos queijos Canastra fabricados pelo produtor C (Lote 02) O tempo de maturação dos queijos avaliados foi de: A) 2 dia, B) 9 dias, C) 16 dias, D) 23 dias e E) 30 dias. A coluna foi equilibrada em solvente A e as proteínas e peptídeos eluídos em gradiente contínuo crescente de acetonitrila (linha contínua), a um fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v)

Semelhante ao resultado obtido neste trabalho, Rizzello et al. (2005) observaram que peptídeos solúveis extraídos de queijos italianos como Mozzarella (sem maturação) e Crescenza (setes dias de maturação) apresentaram perfis cromatográficos ricos em peptídeos hidrofóbicos, eluídos em concentração de acetonitrila superior a 25%. Já o Parmigiano Reggiano (dezoito meses de maturação), se destacou por um cromatograma de características parcialmente hidrofóbicas.

4.4 Atividade antimicrobiana das proteínas e peptídeos solúveis

Como demonstrado na Tabela 9, os queijos do segundo lote do produtor A e os queijos do primeiro lote do produtor C apresentaram ação bactericida contra *E.coli*. As frações coletadas referentes à corrida do tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) no C18-RP-HPLC foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana, porém nenhuma apresentou característica de inibição do microrganismo em estudo.

Tabela 9 Atividade antimicrobiana dos eluatos proteicos e peptídicos solúveis extraídos do queijo Minas artesanal da Canastra contra *E. coli*

Queijo/ Produtor	Lote	Tempo de Maturação (Dias)	Tempo de Retenção no HPLC (Min)	Concentração ¹ (μg de proteínas e peptídeos solúveis/mL de solução)	Concentração Mínima Inibitória ² (MIC) (μg de proteínas e peptídeos solúveis/mL de solução)
A	02	09	24	$46 \pm 0,003$	$15 \pm 0,001$
C	01	23	23	$25 \pm 0,001$	$17 \pm 0,001$
C	01	30	28	$45 \pm 0,003$	$11 \pm 0,001$

1 Concentração de proteínas e peptídeos solúveis presentes nas frações.

2 Quantificação realizada pelo equipamento NanoDrop Lite Spectrophometer (ThermoCientific, U.S.A.)

A Figura 11 demonstra a localização das frações de proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana inserida no perfil obtido por cromatografia líquida. Como podemos observar, as frações foram detectadas abaixo de 40% de solução B (32% de acetonitrila) no perfil cromatográfico de eluição do C18-RP-HPLC, o que infere características parcialmente hidrofóbicas às moléculas proteicas contidas nessas frações.

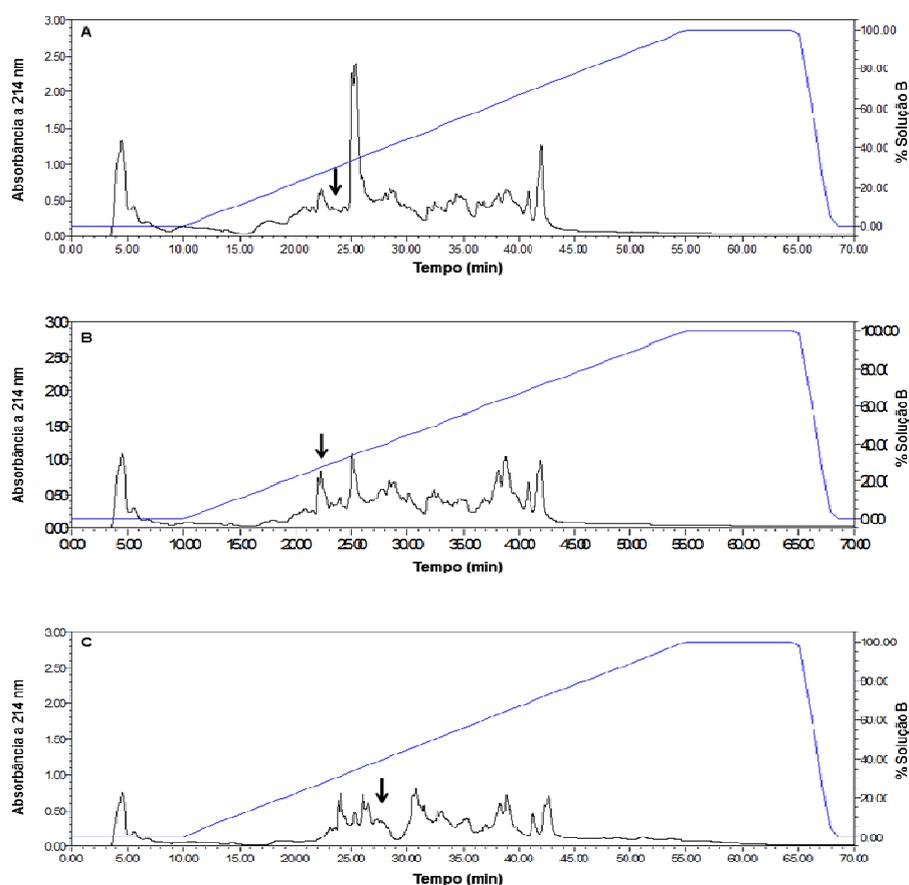


Figura 9 Perfil da cromatografia líquida de fase reversa de proteínas e peptídeos solúveis extraídos dos queijos Canastra Sendo: A) Queijo do produtor A com 9 dias de maturação (Lote 02), B) Queijo do produtor C com 23 dias de maturação (Lote 01), C) Queijo do produtor C com 30 dias de maturação (Lote 01). As setas indicam as frações peptídicas com atividade antimicrobiana

A microbiota presente no queijo, principal responsável pela proteólise, é adquirida principalmente pelo leite cru e o “pingo”. A composição microbiológica do leite é influenciada por inúmeros fatores, como temperatura, acidez, presença de mastite no rebanho, além do uso das boas práticas de fabricação (DINIZ, 2013).

A variação microbiológica do “pingo” é influenciada pela temperatura, pH, concentração de sal e pelo uso das boas práticas de fabricação. Segundo Pinto (2008), não existe padronização do tempo de coleta do “pingo” e quanto maior o tempo que este permanece à temperatura ambiente, maior será o crescimento microbiano, e conseqüentemente menor o pH, gerando maior a acidez titulável. Além disso, ainda é muito diversificada a quantidade de sal adicionada ao queijo, ocasionando significativas diferenças na composição final desse fermento natural, contribuindo para variação acentuada na composição físico-química dos queijos (PAIVA, 2012). De acordo com Coser, Lopes e Costa (2012), a composição microbiológica do “pingo” varia entre regiões produtoras de queijo Minas artesanal e até mesmo entre produtores de uma mesma região.

Quando o produtor constata alguma alteração no queijo em decorrência de contaminação, segundo Silva (2007), 64% dos produtores descartam o fermento e o repõe pela obtenção de pequena quantidade de “pingo” do vizinho que está fabricando bom queijo. Essa é a forma mais simples e prática da rotação de culturas (FURTADO, 1980), podendo ocasionar alterações físico-químicas do queijo de um mesmo produtor.

Além disso, peptídeos bioativos são fragmentos inativos presentes em proteínas que, ao serem liberados por ação de enzimas, podem ser novamente hidrolisados devido à extensa proteólise presente no queijo, perdendo assim as características funcionais (MEISEL; GOEPFERT; GUNTHER, 1997).

Assim como este estudo mostrou que queijos Canastra apresentaram atividade antimicrobiana, Rizzello et al. (2005) extraíram peptídeos solúveis de queijos italianos com elevada ação contra várias bactérias, incluindo *E. coli* em que a concentração de inibição variou de 25 - 400 µg de peptídeos/mL de solução.

Pritchard, Phillips e Kailasapathy (2010) avaliaram a presença de peptídeos com ação anti-hipertensiva, antioxidante e antimicrobiana em três marcas de queijos Cheddar coletados no comércio da Austrália, dividindo os peptídeos extraídos de cada queijo em frações de acordo com a massa (<5 kDa, 5 a 10 kDa e > 10 kDa). Todos os queijos apresentaram ação contra *E. coli* e *B. cereus* em pelo menos uma das frações, porém somente uma marca do queijo Cheddar apresentou ação antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922 em todas as frações.

Silva et al. (2012), no intuito de classificar o queijo Coalho artesanal produzido em diversas regiões do nordeste brasileiro como um alimento funcional, avaliaram a ação antimicrobiana do extrato de peptídeos solúveis na concentração de 50 µg/µL de solução. As maiores atividades foram obtidas em queijos de Cachoeirinha-PE e Venturosa-PE contra *E. faecalis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

4.5 Identificação de Peptídeos solúveis

A Figura 12 representa espectrogramas correspondentes ao MS1 completo das três frações com ação antimicrobiana.

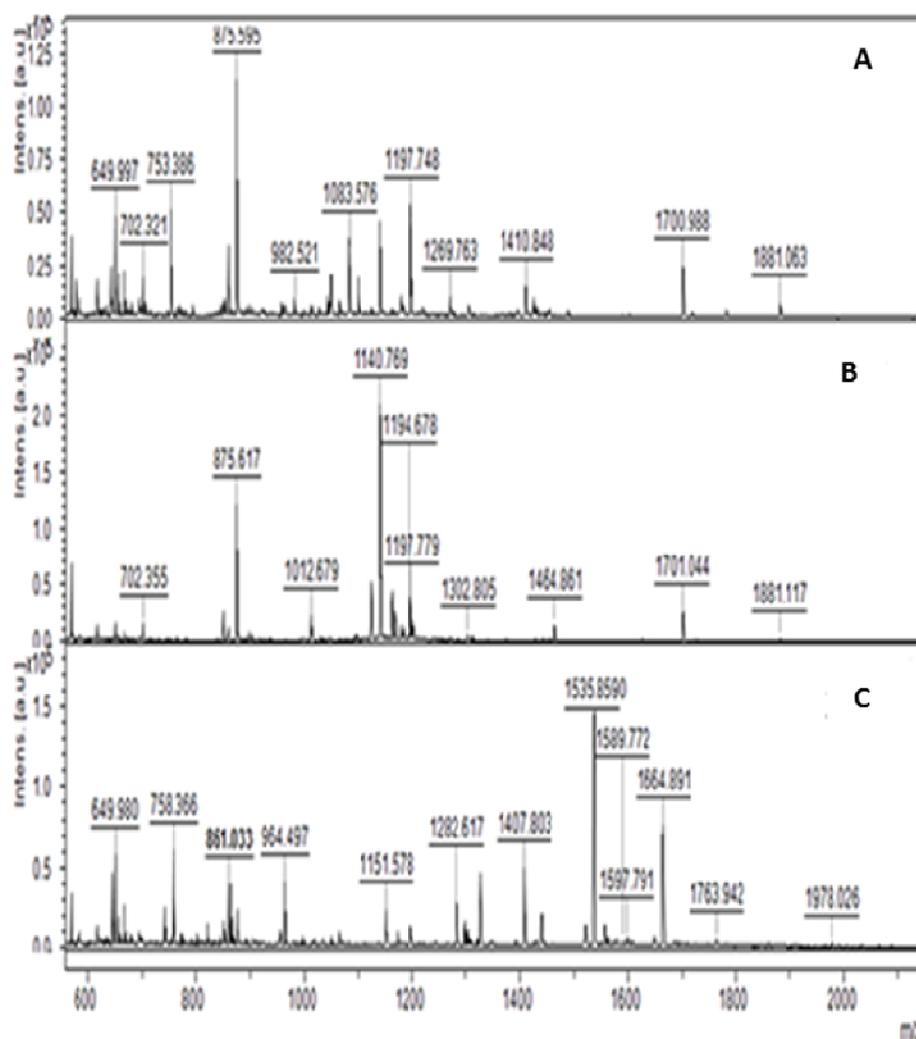


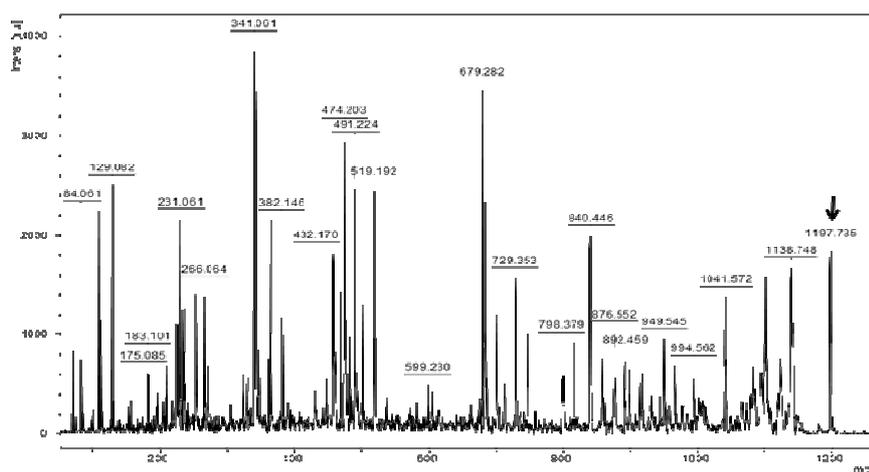
Figura 10 Espectro de massas no modo MS1 em MALDI-TOF/TOF das frações proteicas e peptídicas com características antimicrobianas Sendo: A) Queijo do produtor A com 9 dias de maturação (Lote 02), B) Queijo do produtor C com 23 dias de maturação (Lote 01), C) Queijo do produtor C com 30 dias de maturação (Lote 01)

Os peptídeos encontrados nos espectros de massa no modo MS1 de cada queijo foram fragmentados e submetidos, de forma individual, à espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF, usando fragmentação no método Lift Positivo, gerando espectros de massa no modo MS2. As listas de massas recuperadas foram editadas no *FlexAnalysis* e analisadas pelo programa MASCOT DAEMON.

A identidade dos peptídeos foi avaliada por similaridade de massas quando confrontadas com o banco de dados do UniProt, especificamente com as proteínas do gênero *Bos*.

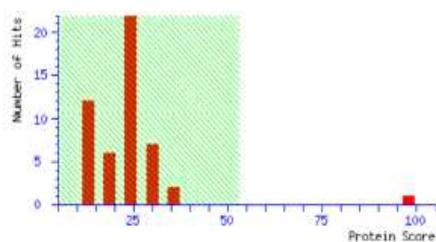
Os peptídeos com massa molecular 1.197 Da, 1.140 Da, 1.535 Da e 1.664 Da foram identificados por similaridade com a proteína α_{s1} -caseína, cujo número de acesso é B5B3R8_BOVIN. Já os peptídeos de massa molecular 1.151 Da e 1.282 Da foram identificados por similaridade com a proteína β -caseína com número de acesso T1T0C1_BOVIN. Ambas originadas de *Bos taurus* de acordo com o banco de dados UniProt (Figuras 13, 14 e 15).

A



Continuação...

B



Peptide Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Standard scoring MudPIT scoring Ions score or expect cut-off Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Require bold red

Error tolerant

1. [tr|B5B3R8|B5B3R8_BOVIN](#) Mass: 24427 Score: 97 Matches: 2(1) Sequences: 2(1)
[tr|B5B3R8|B5B3R8_BOVIN](#)

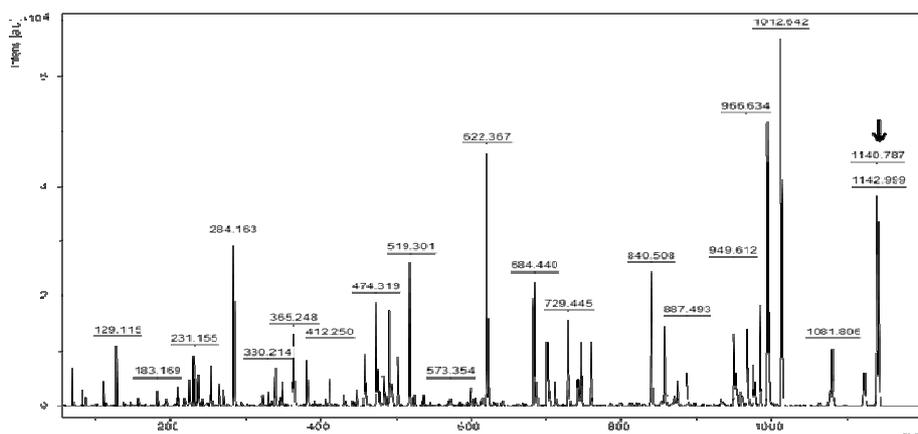
Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
g	1197.7479	1196.7406	1196.6890	0.0516	0	57	0.019	1	U	A.RPKHPIKHQG.L

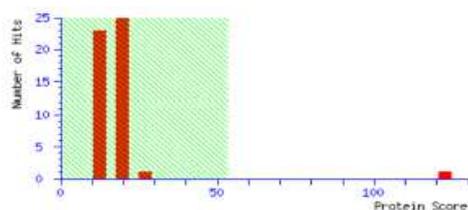
Figura 13 Espectro de massas no modo MS2 em MALDI-TOF/TOF das frações proteicas e peptídica com atividade antimicrobiana referente ao queijo do produtor A com 9 dias de maturação (Lote 02)

(A) Espectros de massas no *FlexAnalysis* e (B) Identificação pelo programa MASCOT. As seqüências de aminoácidos destacadas em vermelho em B correspondem ao pareamento das massas dos peptídeos com as proteínas depositadas no banco de dados UniProt

A



B



Peptide Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$

Max. number of hits

Error tolerant

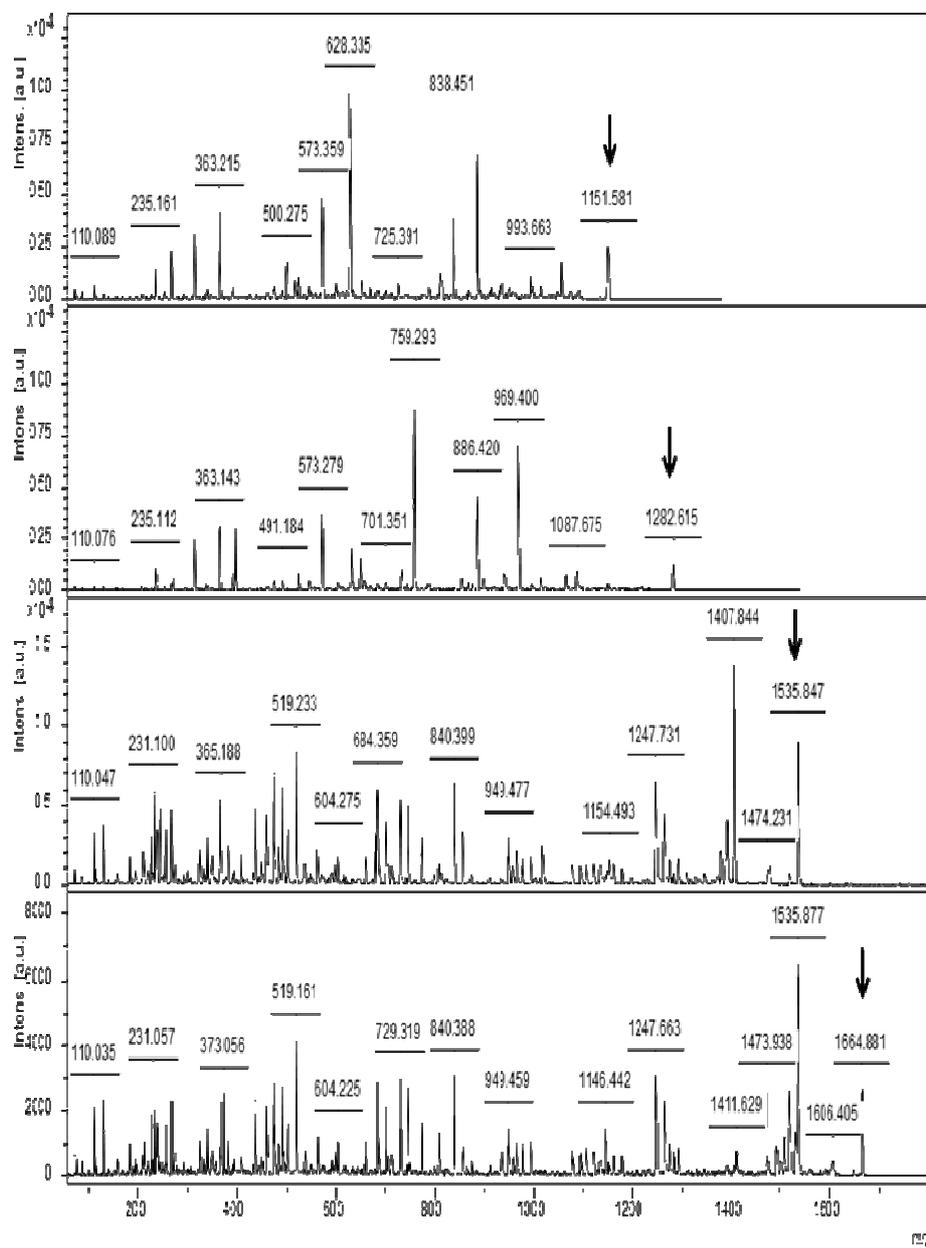
1. [tr|B5B9R8|B5B9R8_BOVIN](#) Mass: 24427 Score: 122 Matches: 3 (1) Sequences: 3 (1)
[tr|B5B9R8|B5B9R8_BOVIN](#)

Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input type="checkbox"/>	7	1140.7693	1139.7620	1139.6676	0.0945	0	55	0.03	1	U A.RPKHPKHKQ.G

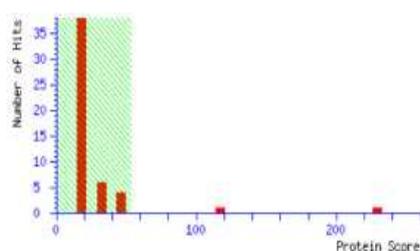
Figura 11 Espectro de massas no modo MS2 em MALDI-TOF/TOF das frações proteicas e peptídica com atividade antimicrobiana referente ao queijo do produtor C com 23 dias de maturação (Lote 01) (A) Espectros de massas no *FlexAnalysis* e (B) Identificação pelo programa MASCOT. As seqüências de aminoácidos destacadas em vermelho em B correspondem ao pareamento das massas dos peptídeos com as proteínas depositadas no banco de dados UniProt

A



Continuação...

B



Peptide Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Standard scoring MudPIT scoring Ions score or expect cut-off Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [tr|B5B3R8|B5B3R8_BOVIN](#) Mass: 24427 Score: 229 Matches: 5(2) Sequences: 5(2)
[tr|B5B3R8|B5B3R8_BOVIN](#)
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 24	1535.8590	1534.8517	1534.8844	-0.0327	0	82	6e-05	1	U	A.RPKHPIKHQGLPQ.E
<input checked="" type="checkbox"/> 25	1664.8909	1663.8836	1663.9270	-0.0434	0	70	0.0011	1	U	A.RPKHPIKHQGLPQ.E

2. [tr|T1T0C1|T1T0C1_BOVIN](#) Mass: 24985 Score: 116 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
[tr|T1T0C1|T1T0C1_BOVIN](#)
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 18	1151.5780	1150.5707	1150.5883	-0.0176	0	62	0.0066	1	U	M.HQPHQLPPT.V
<input checked="" type="checkbox"/> 19	1282.6168	1281.6095	1281.6288	-0.0193	0	61	0.0079	1	U	W.MHQPQLPPT.V

Figura 12 Espectro de massas no modo MS2 em MALDI-TOF/TOF das frações proteicas e peptídica com atividade antimicrobiana referente ao queijo do produtor C com 30 dias de maturação (Lote 01) (A) Espectros de massas no *FlexAnalysis* e (B) Identificação pelo programa MASCOT. As sequências de aminoácidos destacadas em vermelho em B correspondem ao pareamento das massas dos peptídeos com as proteínas depositadas no banco de dados UniProt

O alinhamento de sequências foi realizado usando do programa Clustal Ômega com o objetivo de comparar os peptídeos identificados e as sequências originais das proteínas homologas (Figura 16).



Figura 13 Alinhamento de sequências aminoacídicas de proteínas α_{s1} -caseína (A) e β -caseína (B) comparado aos peptídeos identificados do queijo Canastra

Os aminoácidos idênticos são destacados por (*). Gaps foram introduzidos para melhor alinhamento e representados por traços (--). As análises foram realizadas no programa ClustalÔmega

No intuito de validar os resultados obtidos no MASCOT DAEMON, foi utilizado o SCAFFOLD (Tabela 10).

Tabela 10 Identificação de peptídeos solúveis extraídos dos queijos Minas artesanal da Canastra

Os peptídeos foram coletados por RP-HPLC, identificados por MALDI TOF/TOF, algoritmo MASCOT DAEMON e software SCAFFOLD contra o banco de dados UniProt. **OBS Bos taurus escreve separado e a paginação esta diferente**

Queijo	Lote	Tempo de Maturação (Dias)	Número de acesso	Nome da Proteína / (Espécie)	Banco de dados/ Entrada	Score de identificação (MS/MS)	Prob. (1)	Massa molecular Observada	Massa molecular Calculada	NPIV (3)	Sequência dos peptídeos	Prob. (2)
A	2	9	B5B3R8_BOVIN	α_1 - caseína f(1-9) <i>Bostaurus</i>	UniProt/ <i>Bos</i>	122	96%	1140.7693	1139.6676	01	(A)RPKHPIKHQ(G)	87%
C	1	23	B5B3R8_BOVIN	α_1 - caseína f(1-10) <i>Bostaurus</i>	UniProt/ <i>Bos</i>	97	97%	1197.7479	1196.6890	01	(A)RPKHPIKHQ(L)	89%
C	1	30	B5B3R8_BOVIN	α_1 - caseína f(1-13) <i>Bostaurus</i>	UniProt/ <i>Bos</i>	229	100%	1535.8590	1534.8844	02	(A)RPKHPIKHQGLPQ(E)	95%
				α_1 - caseína f(1-14) <i>Bostaurus</i>				1664.8909	1663.9270		(A)RPKHPIKHQGLPQ(V)	95%
			T1T0C1_BOVIN	B-caseína f(145-154) <i>Bostaurus</i>	UniProt/ <i>Bos</i>	116	100%	1151.5780	1150.5883	02	(M)HQPHQPLPPT(V)	95%
				B-caseína f(144-154) <i>Bostaurus</i>				1282.6168	1281.6288		(W)MHQPHQPLPPT(V)	95%

Legenda: (1) Probabilidade de identificação para proteína (SCAFFOLD)
 (2) Probabilidade de identificação para peptídeo (SCAFFOLD)
 (3) NPIV – Número de peptídeos identificados e validados (SCAFFOLD)

As sequências peptídicas RPKHPIKHQ, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQGLPQ e RPKHPIKHQGLPQE, identificadas como referentes à proteína α_{s1} -caseína, pertencem ao mesmo fragmento sendo possível supor que houve ação de uma protease atuando na extremidade carboxi-terminal e liberando aminoácidos individuais. Até o momento nenhuma bioatividade dos fragmentos acima foi relatada na literatura.

Segundo Moller, Rattraye Ardo(2013) essas sequências isoladas podem ser atribuídas à ação de endopeptidase originadas de *Lactobacillus helveticus* sob isracidina, um peptídeo originado pela hidrólise da α_{s1} -caseína (f1-23) por ação da quimosina (HILL; LAHAV; GIVOL, 1974). Estudos utilizando a isracidina demonstraram a sua ação através da inibição *in vitro* do *Lactobacillus* e outras espécies de bactérias Gram-positivas. No entanto, *in vivo*, esse peptídeo exerceu efeito de inibitório contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* quando administrado em baixas doses em ratos (LAHOV; REGELSON, 1996) e atividade contra mastite em vacas e ovelhas quando injetado no interior do úbere em níveis comparáveis ao tratamento padrão com antibióticos (HAQUE; CHAND, 2008).

O alinhamento de sequências aminoacídicas foi realizado entre a isracidina e o peptídeo RPKHPIKHQGLPQE, com o objetivo de verificar a similaridade entre eles (Figura 17).

Lignitto et al. (2010) observam que os peptídeos derivados da α_{s1} -caseína f(1-9), f(1-13) e f(1-14), extraídos dos queijos Asiago d'allevo ao longo da maturação não apresentaram ação anti-hipertensiva, porém a presença do peptídeo f(1-13) foi detectada antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*, indicando que este pode ser parcialmente protegido de proteólise.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

Isracidina      RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF
Peptídeo        RPKHPIKHQGLPQE-----
                *****

```

Figura 14 Alinhamento de seqüências aminoacídicas do peptídeo isracidina derivado da α_{s1} -caseína comparado aos peptídeos identificados no queijo Canastra. Os aminoácidos idênticos são destacados por (*). Gaps foram introduzidos para melhor alinhamento e representados por traços (--). As análises foram realizadas no programa Clustal Ômega.

Os peptídeos HQPHQPLPPT e MHQPHQPLPPT originados da β -caseína pertencentes ao mesmo fragmento permitem suportar a ação de protease que atua na extremidade amino-terminal de origem microbiana, coalho ou natural do leite. Apesar da funcionalidade desses peptídeos não serem conhecidas, Ohsawa et al. (2008) produziram a seqüência MHQPHQPLPPT através de um modelo de digestão *in vitro*, onde a β -caseína foi hidrolisada pela ação de enzimas digestivas. Segundo os autores, esse fragmento apresentou resistência à digestão gastrointestinal de mamíferos, sendo interessante avaliar as funções fisiológicas desse peptídeo. Courtin et al. (2004) identificaram a presença do peptídeo MHQPHQPLPPT em iogurte pela ação específica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Todos os peptídeos identificados apresentaram no mínimo dois resíduos de prolina. Peptídeos contendo o aminoácido prolina são geralmente resistentes à degradação por enzimas digestivas devido à sua capacidade de formar ligação peptídica com isomeria *cis*, dificultando a rotação da cadeia peptídica e evitando acomodação nos sítios ativos das enzimas (BREZNIK et

al., 2001;GENTILUCCI; DE MARCO; CERISOLI, 2010). Com isso, esses peptídeos são capazes de sobreviver à digestão gastrintestinal, serem absorvidos e alcançarem órgãos ou tecidos-alvos (FITZGERALD; MEISEL, 2000; VERMEIRSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE, 2004).

Devido à pouca disponibilidade de estudos envolvendo a bioatividade dos peptídeos identificados neste trabalho, são interessantes novos estudos envolvendo a purificação e o isolamento desses peptídeos e posteriormente a avaliação do quanto cada um contribui para a inibição da *E. coli*.

5 CONCLUSÃO

Frações com atividades antimicrobianas sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, foram extraídas de queijos Canastra com 09, 23 e 30 dias de maturação. Seis peptídeos contidos nessas frações foram identificados: HQPHQPLPPT, MHQPHQPLPPT, RPKHPIKHQ, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQGLPQ, RPKHPIKHQGLPQE. A formação de peptídeos antimicrobianos naturalmente no queijo depende, principalmente, de um complexo equilíbrio entre a fabricação e o tempo de maturação.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999**. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, 1999.

ALMEIDA, E. F. L.; FERNANDES, M. R. **Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal**. São Roque de Minas: Emater-MG, 2004. 19 p.

ARIAS-ARANDA, D.; ROMEROSA-MARTÍNEZ, M. M. Innovation in the functional foods industry in a peripheral region of the European Union: Andalusia (Spain). **FoodPolicy**, Guildford, v. 3, n. 35, p. 240-246, 2010.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**: produção, industrialização e análise. 15. ed. São Paulo: Nobel, 1985.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 259-274, 2001.

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K. Combinatorial libraries: a tool to design antimicrobial and antifungal peptide analogues having lytic specificities for structure-activity relationship studies. **Biopolymers**, New York, v. 55, p. 74-87, 2000.

BORELLI, B. B. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 1115-1119, 2006.

BOUTROU, R. et al. Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 97, p. 1314-1323, 2013

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; FONSECA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Cultura. **Queijo artesanal de Minas**. 2008. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

BREZNIK, M. et al. Influence of chirality of the preceding acyl moiety on the *cis/trans* ratio of the proline bond. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 66, p. 7044-7050, 2001.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa; São Paulo: Tortuga, 1998. p.88.

CABEZA, L. et al. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 11-17, 2007.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.13, p.191-200, 2003.

CARPINO, S. et al. Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of ragusano cheese revealed by tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 23, p. 12443-12452, 2011.

CHENG, X. et al. Antibacterial effect and hydrophobicity of yak k-casein hydrolysate and its fractions. **International Dairy Journal**, Barking, v. 31, p.111-116, 2013.

COURTIN, P.; RUL, F. **Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model**. *Le Lait*, v. 84, p. 125-134, 2004.

COSER, S. M.; LOPES, M.A.; COSTA, G.M. Mastite bovina: controle e prevenção. **Boletim técnico da Universidade Federal de Lavras**, Lavras, n. 93, p.1-30, 2012.

DINIZ, M. F. S. **Queijo Canastra: um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento**. 2013. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

DORES, M. T. **Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

EARLY, R. **The technology of dairy products**. 2nd ed. Londres: Blackie, 1998.

ECK, A. **O queijo**. [S. l.]: Europa-América, 1987. v. 1, 336p. (Coleção EUROAGRO).

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. 2014a. **Mapa do queijo**. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 29 out. 2014.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. 2014b. **O Programa**. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 29out.2014.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. 2014c. **Mapa da Canastra**. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 29 out. 2014.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science e Technology**, Oxford, v. 1, p. 37-40, 1990.

FARRELL JÚNIOR, H. M. et al. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v. 11, p. 135-147, 2006.

FARRELL JÚNIOR, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk – Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

FITZGERALD, R.; MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p.33–37, 2000. Suppl.

FOLTZ, M. et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 8, p. 137-953, 2007.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects**. London: Chapman e Hall, 1993. v. 1.

FOX, P. F. et al. Biochemistry of cheese ripening. In:_____. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2nd ed. London: Chapman e Hall, 1993. v. 2, p. 388-438.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. H. L. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie, 1998.

FOX, P. F. Milk proteins: general and historical behaviour, em: FOX P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. 3rd ed. New York: Kluwer /Plenum, 2003. v. 1.

FURTADO, M. M. Queijo do Serra: tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, p. 33 – 36, 1980.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory of ripening chesse. **International of Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 751-761, 1998.

GENTILUCCI, L.; DE MARCO, R.; CERISOLI, L. Chemical modifications designed to improved peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptides bonds, and cyclization. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 16, p. 3185-3203, 2010.

GOBBETT, M. et al. Study of the temperature pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. **International of Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 865-875, 1999.

GOMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, p. 697-706, 2002.

GUPTA, A. et al. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, p. 339–347, 2009.

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 7-15, 2008.

HEBERT, E. M.; SAAVEDRA, L.; FERRANTI, P. Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. In: MOZZI, F.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. (Ed.), **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p. 233–249.

HILL, R. D.; LAHAV, E.; GIVOL, D. A rennin-sensitive bond in β -casein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 41, n. 1, p. 147–153, 1974.

HSUEH, P. R.; CHEN, W. H.; LUH, K. T. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991 to 2003 at a university hospital in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 26, p. 463–472, 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Cheese and cheese processed cheese, determination of the total solids content**. Brussels, 1982. (Standard 4A).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of pH**. Brussels, 1989. (Standard n. 115A).

JONES, F. S.; SIMMS, H. S. The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 51, p. 327–339, 1930.

JUILLARD, V. et al. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1230–1236, 1998.

KORHONEN, H. J. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 64, p. 16–25, 2009a.

KORHONEN, H. J. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, Oxford, v. 1, p. 177–187, 2009b.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 16, p.945–960, 2006.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides- opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 9, p. 1297–1308, 2003.

LAHOV, E. et al. Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 26, p. 489- 495, 1971.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and Immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v.34, p. 131–145, 1996.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v.23, p.2947-2948, 2007.

LEDOUX, N. et al. Intraluminal immunoreactive caseinomacropeptide after milk protein ingestion in humans. **Food / Nahrung**, Charlottesville, v. 43, p. 196-200, 1999.

LIGNITTO, L. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, p.11–17, 2010.

LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, Amsterdam, v. 15, p. 73–83, 2010.

LOPEZ-EXPOSITO, I. et al. Identification of antibacterial peptides from ovine α_{s2} -casein. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p.1072–1080, 2006.

MACCANN, K. B. et al. Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164–207) region of bovine α_{s2} -casein. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p. 133–143, 2005.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Peptídeos bioativos e bactérias probióticas. In: SAAD, S. M. I. et al. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. p. 85-104.

MALKOSKI, M. et al. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, p. 2309-2315, 2001.

MAO, X. Y. et al. Effect of yak milk casin hydrolysate on Th1/Th2 cytokines production by murine spleen lymphocytes in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 638–642, 2007.

MEIRA, S. M. M. et al. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, Barking, v. 48, p. 322–329, 2012.

MEISEL, H. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 56, p. 83–91, 2001.

MEISEL, H.; GOEPFERT, A.; GUNTHER, S. **ACE inhibitory activities in milk products**. *Milchwissenschaft*, v. 52, p. 307–311, 1997.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5/6, p. 363-373, 1998.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002**. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31/01/2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 2002a. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2013.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Decreto nº 44.864, de 1 de agosto de 2008**. Altera o Regulamento da Lei n. 14.185, de 31/01/2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 2008. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2013.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004**. Identifica a microrregião da Canastra. Belo Horizonte, 2004. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2013.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Portaria nº 818, de 12 de dezembro de 2006**. Baixa o Regulamento Técnico de Produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2013.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013**. Estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2013. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2013.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Portaria nº 11.186, de 12 de dezembro de 2011**. Proíbe o uso de aditivos e coadjuvantes de tecnologia ou elaboração na fabricação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2002b. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 27 set. 2013.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002**. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2002b. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2013.

MOLLER, K. K.; RATTRAY, F. P.; ARDO, Y. Application of selected lactic acid bacteria and coagulant for improving the quality of low-salt Cheddar cheese: Chemical, microbiological and rheological evaluation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 33, p. 163-174, 2013.

NAGHMOUCHI, K.; DRIDER, D.; FLISS, I. Action of divergicin M35, a class II bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 1508-1517, 2007.

NAKAMURA, Y. et al. Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, p. 777-783, 1995.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, 2010.

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

OHSAWA, K. et al. Producibility and digestibility of antihypertensive β -Casein Tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, London, v. 56, p. 854-858, 2008.

ONG, L.; SHAH, N. P. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. **Food Science and Technology**, London, v. 41, p. 1555-1566, 2008.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra – MG**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

PACHECO, M. T. B.; ANTUNES, A. E. C. Leite e sistema cardiovascular. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009. p.271-290.

PAIVA, P. H. C. **Tratamento da casca de queijo Canastra com resina e seus efeitos durante a maturação e na qualidade como forma de melhor o aspecto e de agregar valor ao produto.** 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 285–297, 1997.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, New York, v. 24, p. 1693–170, 2003.

PARK, Y. W.; JIN, Y. K. Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 28, p. 263–272, 1998.

PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 9, p. 1225–1238, 2003.

PELLEGRINI, A. et al. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the b-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1526, p. 131–140, 2001.

PELLEGRINI, A. et al. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine a-lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1426, p. 439–448, 1999.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **Songklanakarinn Journal Science Technology**, Songkhla, v. 27, p. 201–212, 2005.

PHELAN, M. et al. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, p. 643–654, 2009.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p. 1306–1314, 2006.

PIHLANTO, A.; KORHONEN, H. Bioactive peptides and proteins. **Food and Nutrition Research**, Philadelphia, v. 47, p. 175–276, 2003.

PIHLANTO-LEPPALA, A. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, p. 53–64, 2000.

PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. **Processamento de leite de consumo**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. Apostila.

PINTO, M. S. **Efeito da Microbiota Endógena e da Nisina sobre *Listeria sp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

PRIPP, A. H. et al. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. **LWT**, London, v. 39, p. 677–683, 2006.

PRITCHARD, S. R.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. **Food Research International**, Barking, v. 43, p. 1545–1548, 2010.

RECIO, I.; VISSER, S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1428, p. 314–326, 1999.

REGAZZO, D. et al. The (193–209) 17-residues peptide of bovine b-casein is transported through Caco-2 monolayer. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 35, p. 54–1428, 2010.

RESENDE, M. F. S. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.

RESENDE, M. F. S. **Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RIZZELLO, C. G.; LOSITO, I.; GOBBETTI, M.; CARBONARA, T.; DE BARI, M. D.; ZAMBONIN, P.G. Antibacterial Activities of Peptides from the Water-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 2348-2360, 2005.

RYHANEN, E.; PIHLANTO-LEPPALA, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 441–447, 2001.

SHIMIZU, M.; Modulation of intestinal functions by food substances. **Die Nahrung**, Weinheim, v. 8, p. 43-154, 1999.

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do Queijo Minas artesanal da Canastra**. 2007. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, J. G. et al. Característica físico-química do Queijo Minas artesanal da Canastra. *Revista do Instituto Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora*, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007. 552p.

SILVA, P. H. F. et al. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 50, p. 15-29, 1995.

SILVA, R. A. **Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil**. 2012. 210 f. Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p. 1-15, 2005.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, New York, v.150, p. 76-86, 1985.

SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; McSWEENEY, P. L. H. Advance in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v.11, p. 327-345, 2001.

TEODORO, V. A. M. et al. Aspectos legais dos queijos artesanais mineiros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 34, n. 273, p. 7-16, 2013.

THEÓLIER, J. et al. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. **Journal of Functional Foods**, Oxford, v. 5, p. 706-714, 2013.

THOMAS, T. D.; PRITCHARD, G. G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 46, p. 245–268, 1987.

THOMSON, J. M.; BONOMO, R. A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 518-524, 2005.

TIMÓN, M. L. et al. Identification of radical scavenging peptides (<3 kDa) from Burgos-type cheese. **Food Science and Technology**, London, v.57, p. 359-365, 2014.

UENO, K.; MIZUNO, K.; YAMAMOTO, N. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 313–318, 2004.

VAN-BERESTEIJN, E. C. H. et al. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, p. 619-625, 1994.

VERMEISSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, p. 357–366, 2004.

VILJOEN, B.C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Microbiology**, Stuttgart, v.69, p.37-44, 2001.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiro. **Revista Boletim do Leite**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1- 8, 1983.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. W.; LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijos Minas Frescal. **Revista do Instituto Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 44, p. 261-266, 1989.

ZUCHT, H. D. et al. Casocidin-I: α_{s2} -casein derived peptide exhibits antibacterial activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 372, p. 185-188, 1995.