



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

SUELEN RIBEIRO MOITA

PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS EXTRAÍDOS DE DIFERENTES TIPOS DE
QUEIJOS E AVALIADOS POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

Brasília

2011

SUELEN RIBEIRO MOITA

PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS EXTRAÍDOS DE DIFERENTES TIPOS DE
QUEIJOS E AVALIADOS POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

Monografia apresentada à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília como requisito
parcial para obtenção do grau de médico
veterinário.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia de Aguiar
Ferreira

Brasília
2011

Nome do autor: Moita, Suelen Ribeiro

Título: Peptídeos biologicamente ativos extraídos de diferentes tipos de queijos e avaliados por meio de espectrometria de massa.

Monografia de conclusão de Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: ____ de dezembro de 2011.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Márcia de Aguiar Ferreira

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

Profa. Msc. Stefania Marcia de Oliveira Souza

Julgamento: _____

Instituição: União Educacional do Planalto Central

Assinatura: _____

Msc. Eduardo Fernandes Barbosa

Julgamento: _____

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família: minha mãe Irani e irmãs Susana e Rosana. E as pessoas que me deram a chance de crescer nessa minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado em cada passo que eu dei até hoje na minha vida, por ter me dado saúde, disposição e força, e me abençoado para que eu alcançasse a vitória da minha formação acadêmica.

Agradeço a minha mãe e as minhas irmãs, que têm sido minhas companheiras, conselheiras e tem me ensinado o sentido do amor, do respeito e da lealdade.

Agradeço ao meu pai, que me deu apoio financeiro e me ajudou a assumir responsabilidades que me possibilitaram adquirir experiências enriquecedoras do meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço aos meus amigos que me amaram, apoiaram, aconselharam, discordaram de mim, quando foi necessário, e participaram dos momentos mais difíceis e mais felizes da minha vida.

Agradeço, por fim, aos professores que deram a oportunidade de eu me desenvolver como profissional e praticar o conhecimento adquirido durante o curso de medicina veterinária, em especial o professor Luciano Paulino e a professora Márcia Aguiar.

RESUMO

Peptídeos bioativos (PBA) são fragmentos de proteínas que exercem uma determinada atividade ao interagirem com células específicas no organismo desencadeando respostas bioquímicas e fisiológicas. Esses peptídeos são inativos dentro da cadeia proteica intacta, mas podem ser liberados por mecanismos de proteólise tornando-se ativos. Peptídeos bioativos têm sido isolados de diversos alimentos de origem animal, como carnes e ovos, e origem vegetal, como algas e soja. Os alimentos de origem láctea têm apresentado um destaque nos estudos com PBA, pois as proteínas do leite são as que disponibilizam maior variedade de peptídeos com atividade biológica. Considerando o leite como um alimento que apresenta propriedades nutricionais importantes, sendo o precursor de diversos alimentos apreciados pelo homem, como os queijos, o presente estudo teve como objetivo avaliar os peptídeos provenientes de diferentes tipos de queijos preparados sob diferentes condições e atividade microbiológica, possuindo propriedades sensoriais distintas, embora originados de uma mesma fonte de proteínas. O estudo foi realizado com queijos dos tipos minas meia cura, requeijão, provolone, parmesão, coalho, prato, minas frescal e mussarela, coletados em uma feira do Distrito Federal. Os procedimentos para a extração dos peptídeos das amostras foram realizados utilizando solventes polares e apolares e em seguida, as amostras resultantes foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF e TOF/TOF. Os resultados indicaram a presença de uma variedade de peptídeos extraídos de cada amostra de queijo a partir dos solventes escolhidos, sendo um fator que possibilita a identificação e distinção dos diferentes tipos de queijo, com base em suas características moleculares, considerando que determinados peptídeos foram detectados em todas e outros apenas em algumas amostras. Os resultados obtidos foram avaliados por meio do método de estatística multivariada, o qual permitiu a distinção entre os diferentes queijos, bem como o seu agrupamento com base em suas características moleculares. A revisão da literatura com foco na presente abordagem mostrou a origem protéica de alguns dos peptídeos extraídos, tais como os resíduos de aminoácidos aos quais constituem. Deste modo, o presente estudo mostrou que é possível a utilização desta abordagem experimental com a finalidade de distinguir queijos de diferentes tipos, com a perspectiva de identificação de queijos com base nas propriedades biológicas inerentes a peptídeos específicos encontrados nesse derivado lácteo.

Palavras-chave: Queijo; Espectrometria de massa; Peptídeos bioativos

ABSTRACT

Bioactive peptides (PBA) are fragments of protein that perform a particular activity by interacting with specific cells in the body producing biochemical and physiological responses. These peptides are inactive within protein chain intact, but can be released by proteolysis mechanisms becoming active. Bioactive peptides have been isolated from various foods of animal origin such as meat and eggs, and vegetable origin, such as algae and soybeans. The dairy products have presented an emphasis on studies with PBA because milk proteins offer greater variety of biologically active peptides. Whereas milk as a food which has important nutritional properties, being the precursor of many products enjoyed by human, such as cheeses, the present study aimed to evaluate the peptides from several types of cheeses produced at different conditions and microbial activity, having distinct sensory properties, although originated from the same source of protein. This study was carried out with different types of cheese, such as half cure cheese, cream cheese, provolone cheese, parmesan cheese, curd cheese, minas fresh cheese and mozzarella, collected in the Distrito Federal (Brazil) fair. The procedures for extraction of peptides were performed using polar and nonpolar solvents, and the results were analyzed by mass spectrometry MALDI-TOF and TOF / TOF. The results indicated the presence of a variety of peptides extracted from each sample cheese from the solvents chosen, being a factor that allows the identification and distinction of different types of cheese, based on their molecular characteristics, considering that certain peptides were detected at all and others only in some samples. The results were evaluated by multivariate statistical analysis which allowed the distinction among the different cheeses, as well as grouping based on their molecular characteristics. The literature review focused on present approach showed the origin of protein of some extracted peptides, such as amino acid residues which constitute them. Thus, this study showed that it is possible to use this experimental approach in order to distinguish different types of cheeses, with a view to identifying cheeses based on biological properties inherent to specific peptides found in dairy products.

Key-words: Cheese; Mass spectrometry; Bioactive peptides

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. CASEÍNAS.....	9
3. PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE	11
4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PBA.....	12
Peptídeos inibidores da enzima conversora de Angiotensina (ECA).....	12
Peptídeos opióides.....	13
Peptídeos imunostimulantes.....	13
Peptídeos antimicrobianos.....	13
Peptídeos antitrombóticos.....	14
5. QUEIJOS.....	15
6. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS TIPOS DE QUEIJOS.....	16
7. PBA EXTRAÍDOS DE DIFERENTES TIPOS DE QUEIJOS.....	17
8. APLICAÇÕES DOS PBA.....	18
9. ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	19
10. OBJETIVOS.....	22
11. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
Coleta de amostras.....	22
Extração dos peptídeos.....	22
Preparação da placa para análise no MALDI-TOF e TOF/TOF.....	25
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
13. CONCLUSÕES.....	37
14. PERSPECTIVAS.....	38
15. REFERÊNCIAS.....	39

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos biologicamente ativos ou bioativos (PBA) são definidos como fragmentos de proteínas que se mantêm inativos dentro da cadeia da proteína precursora, porém quando liberados eles podem interagir com células no organismo, induzindo respostas fisiológicas e proporcionando benefícios à saúde (MEISEL & BOCKELMANN, 1999). Os fragmentos peptídicos com potenciais funções bioquímicas e fisiológicas podem ser liberados da proteína precursora por meio de diferentes processos proteolíticos, como pela hidrólise enzimática durante o processo digestivo; pela fermentação do leite e maturação de queijos, por meio da ação de culturas microbiológicas ou; pela ação de proteinases e peptidases de bactérias ácido-láticas. O tamanho das sequências dos PBA pode variar em torno de 2 a 20 resíduos de aminoácidos (KORHONEN, 2009).

Diversas fontes protéicas alimentares têm mostrado potenciais fontes de PBA, que podem ser encontrados em proteínas de origem animal, como carne de frango (SAIGA et al, 2003), carne suína (ARIHARA et al, 2001), peixes (FUJITA et al, 2001) e ovos (MIGUEL et al, 2004), bem como em proteínas vegetais, como soja (WU & DING, 2002) e algas (SUETSUNA et al, 2004). Nas últimas décadas, estudos têm sido desenvolvidos com PBA presentes nas proteínas do leite. De acordo com Meisel & Bockelmann (1999) o leite é a principal fonte, até o momento, de diversos PBA, pois uma grande variedade de peptídeos já foi codificada na cadeia primária das suas proteínas.

O leite é um alimento que possui grande importância nutricional por conter uma ampla gama de proteínas que promovem proteção contra patógenos intestinais e são essenciais para a manufatura e caracterização de diversos produtos lácteos. O leite bovino normal contém um teor de proteína total em torno de 3,5%, sendo que 80% constituem-se em caseínas e 20% em proteínas do soro. As caseínas e as proteínas do soro são fonte de aminoácidos essenciais e indispensáveis para o adequado crescimento e manutenção do organismo humano (PARK, 2009).

2. CASEÍNAS

A caseína é uma proteína organizada em micelas, que se precipita por meio da acidificação do leite, em pH 4,6 e temperatura em torno de 20°C. Micelas compreendem um agrupamento complexo de proteínas dispersas na forma de partículas coloidais, que são

ligadas a pequenas quantidades de citrato e possuem aproximadamente 7% de fosfato de cálcio em sua composição. A presença de resíduos de aminoácidos fosforilados na caseína promove uma interação com o fosfato de cálcio, formando pequenos conjuntos de íons envoltos por uma camada de proteína, as fosfoproteínas (OLIVEIRA & TIMM, 2007).

As micelas de caseína são estruturas relativamente esféricas com um raio aproximado de 100 nm de diâmetro e massa molecular de 10^9 Da. A molécula de caseína possui tanto regiões hidrofóbicas, como hidrofílicas, sendo que a sua conformação deixa expostos os resíduos hidrofóbicos, o que promove uma forte associação entre as moléculas de caseína e as torna insolúveis em água. Cerca de 80 a 90% da caseína do leite estão organizados na forma de micelas. Os fatores que favorecem a formação das micelas em solução aquosa são aqueles que promovem as interações hidrofóbicas, como a elevação de temperatura e a adição de sais. O leite bovino possui quatro tipos de caseína: alfa S1 e S2 (α_{s1} e α_{s2}), beta (β) e kappa (κ) (OLIVEIRA & TIMM, 2007).

A caseína α_{s1} é uma fosfoproteína que possui massa molecular de aproximadamente 23 kDa, é constituída por uma sequência de 199 resíduos de aminoácidos, e é formada por duas regiões hidrofóbicas, nas quais se distribuem os resíduos de prolina, intermediadas por uma zona polar, onde está presente a maior parte dos fosfatos. Desse modo, a caseína α_{s1} é considerada uma cadeia polipeptídica frouxa e flexível e precipita com níveis muito baixos de cálcio (OLIVEIRA & TIMM, 2007).

A caseína α_{s2} é uma fosfoproteína que possui massa molecular aproximada de 25 kDa, uma sequência de 207 resíduos de aminoácidos, e é formada por uma estrutura bipolar, em que as cargas negativas estão dispostas mais na região N-terminal, e as cargas positivas estão mais concentradas na região C-terminal. Essa proteína precipita com níveis ainda mais baixos de cálcio, se comparada à caseína α_{s1} (OLIVEIRA & TIMM, 2007).

A caseína β possui uma sequência de 209 resíduos de aminoácidos, incluindo resíduos de serina fosforilados e prolinas, e massa molecular de 24 kDa. Possui a porção hidrofílica na região N-terminal e a hidrofóbica na região C-terminal, e também é considerada uma fosfoproteína bastante sensível a precipitação pelo cálcio, embora menos que as caseínas α_{s1} e α_{s2} (OLIVEIRA & TIMM, 2007).

A caseína κ possui uma sequência de 169 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 19 kDa e apenas um grupo fosfoserina em sua composição, além da presença de modificações pós-traducionais relacionadas a carboidratos. Por isso, ela é considerada uma glicoproteína, diferente das outras caseínas, comportando-se de forma estável diante da

presença de íons de cálcio. Portanto, a caseína κ é responsável pela estabilidade estrutural das micelas. Essa proteína está localizada na superfície das micelas de caseína, estando ligadas por sua porção hidrofóbica, enquanto a porção hidrofílica é constituída por filamentos expostos projetados na fase aquosa, que impedem a agregação entre as micelas (OLIVEIRA & TIMM, 2007).

3. PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

As proteínas do soro de leite têm uma estrutura globular relativamente estável devido à presença de algumas ligações dissulfeto. As principais proteínas presentes no soro constituem-se nas frações de beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e os glicomacropéptídeos. Essas proteínas podem ter diferentes massas moleculares, tamanho e função (HARAGUCHI et al, 2008).

A beta-lactoglobulina é a maior proteína, representando proporcionalmente cerca de 50% da quantidade de proteínas do soro do leite bovino. Possui média massa molecular média de 18 kDa, o que a torna resistente a ação de enzimas proteolíticas durante o processo digestivo, fazendo com que seja integralmente absorvida no intestino delgado. Essa proteína não está presente no leite humano, porém é um importante carreador de retinol ou pró-vitamina A nos animais mamíferos neonatos (ANTUNES, 2003).

A alfa-lactoalbumina constitui cerca de 13% das proteínas do soro do leite bovino, é considerada de rápida digestão, pois possui uma massa molecular em torno de 14 kDa, e tem a capacidade de se ligar ao cálcio e ao zinco, sendo o cálcio o estabilizador de sua estrutura. É rica em aminoácidos essenciais e contém maior abundância de triptofano, se comparada a todas as outras fontes alimentares de proteína. Representa a principal proteína no soro do leite humano e é fonte de peptídeos que apresentam atividade contra algumas bactérias patogênicas como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. (HARAGUCHI et al, 2008).

A albumina do soro bovino (BSA) possui alta massa molecular de 69 kDa. É rica em resíduos de cistina e possui afinidade por certos lipídios e substâncias responsáveis pelo odor. A sua ligação com ácidos graxos insolúveis a torna estável contra desnaturação. A albumina do soro bovino do leite é igual à BSA encontrada no soro sanguíneo (ANTUNES, 2003).

As imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e IgE estão presentes no leite bovino, sendo que a IgG é a principal, pois constitui cerca de 80% em quantidade no soro. No soro do leite humano a IgA é a principal imunoglobulina, constituindo mais de 90% em quantidade no

soro. Possuem alta massa molecular, variando de 150 a 1000 kDa, apresentam atividade antioxidante e promovem a imunidade passiva no organismo. (HARAGUCHI et al, 2008; ANTUNES, 2003).

Os glicomacropéptídeos são derivados da κ caseína, pela ação da quimosina, no processo de coagulação durante a produção do queijo, e esses péptídeos estão presentes em um tipo de proteína do soro, a “*whey rennet*”. Possuem alto teor (47%) de aminoácidos essenciais e favorecem a absorção de minerais pelo epitélio intestinal, pois possuem alta carga negativa (HARAGUCHI et al, 2008).

As demais proteínas do leite constituem-se em beta-microglobulinas, gama-globulinas, lactoperoxidases, lactolinas, lactofanos, lactoferrinas, lisozimas, relaxinas, fatores de crescimento (IGF1 e IGF2) proteoses e peptonas, bem como aminoácidos livres, e correspondem aos péptídeos secundários, pois estão presentes em concentrações bem menores no soro do leite (HARAGUCHI et al, 2008).

Além da presença de proteínas que desempenham funções específicas no leite, seja de reserva de aminoácidos ou de atividades biológicas, estudos recentes têm mostrado que as proteínas do leite também constituem uma importante fonte de péptídeos biologicamente ativos (PBA) com funções específicas distintas daquelas das proteínas de origem. Muitos destes péptídeos são conhecidos, ainda, por revelarem propriedades multifuncionais, apresentando mais de uma atividade biológica. De fato, uma variedade de atividades reguladoras dos PBA tem sido descritas na literatura, dentre as mais reportadas são a ação hipotensora, opióide, imunoestimulante, antimicrobiana e antitrombótica, sendo que muitos PBA são multifuncionais (SRINIVAS & PRAKASH, 2010; LÓPEZ-FANDIÑO et al, 2006; GILL et al, 2000; MEISEL & BOCKELMANN, 1999).

4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PBA

Peptídeos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A ação hipotensora dos PBA está relacionada com a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é uma enzima que faz parte do sistema renina-angiotensina, e atua na manutenção da pressão sanguínea periférica, sendo que a sua inibição possui efeitos hipotensores. Os péptídeos inibidores da ECA derivados da caseína representam diferentes fragmentos da caseína humana ou bovina como, por exemplo, as casocininas e as lactocininas. A relação função-estrutura desses péptídeos ainda não está bem estabelecida (MEISEL, 1998).

Peptídeos opióides

Os peptídeos opióides se ligam aos receptores opióides (μ , κ ou σ) exercendo uma atividade agonista como, por exemplo, a β -casomorfina, que constitui o maior peptídeo opióide exógeno já descrito, e é adquirida de fragmentos da sequência da caseína β . A β -casomorfina já foi descoberta em posições sequenciais análogas na caseína β do leite de ovelhas, búfalas e de humanos. Os peptídeos opióides também podem exercer atividade antagonista sobre os seus receptores, como a caseína κ (casoxina) bovina e humana, a caseína α_1 e a lactoferroxina, encontrada na lactoferrina, em humanos (MEISEL & BOCKELMANN, 1999).

Peptídeos imunoestimulantes

Os peptídeos imunoestimulantes, também chamados imunopeptídeos têm sido caracterizados por testes com sistemas *in vitro* ou *in vivo*. Os imunopeptídeos derivados da caseína incluem fragmentos específicos da caseína α_1 e da caseína β . Esses fragmentos biologicamente funcionais podem variar a sua sequência de aminoácidos entre as diferentes espécies (de animais e humana) sendo que algumas sequências já foram determinadas. Eles estimulam a atividade ou a proliferação de células do sistema imunológico como as células fagocíticas ou os linfócitos, porém o mecanismo pelo qual esses peptídeos exercem essa atividade imunorreguladora ainda não foi elucidado (MEISEL, 1998).

Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos incluem os derivados da lactoferrina, que é uma glicoproteína que se liga ao ferro, presente na maioria dos fluidos do organismo dos mamíferos, inclusive o leite, e é uma molécula importante na proteção contra infecções bacterianas. A ação antibiótica do peptídeo derivado da lactoferrina chamado lactoferricina e seus análogos sintéticos parecem estar relacionados com a carga líquida positiva desses peptídeos. Sabe-se que estruturas peptídicas catiônicas anfipáticas em α -hélice são relatadas como tendo atividade antimicrobiana pela formação de canais iônicos através da membrana, alterando a permeabilidade dos microorganismos. Portanto, acredita-se que as lactoferricinas possam ter mecanismo de ação semelhante ao da lactoferrina sobre os microorganismos patológicos (MEISEL, 1998).

Peptídeos antitrombóticos

A partir da clivagem da caseína k bovina é possível produzir peptídeos derivados, como as casoplatelinas, que possuem atividade inibidora da agregação plaquetária, bem como da ligação do fibrinogênio aos sítios receptores específicos sobre a superfície das plaquetas, por meio de competição dos sítios receptores (MEISEL, 1998). Recentemente, foi reportado que os caseinoglicopeptídeos são uma fonte de peptídeos com ação antitrombótica (SILVA & MALCATA, 2005).

Tabela 1. Relação de algumas atividades biológicas de fragmentos de peptídeos de proteínas do leite, já relatados na literatura. A: alanina; D: ácido aspártico; E: ácido glutâmico; F: fenilalanina; G: glicina; H: histidina; I: isoleucina; K: lisina; V: valina; L: leucina; M: metionina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: treonina; W: triptofano; Y: tirosina.

Proteína Precursora	Sequência de Peptídeos	Atividade Biológica	Referências
Caseína β e caseína κ	VPIPP	Hipotensora	Nakamura et al, 1995; Nakamura, Yamamoto, Sakai e Takano, 1995
Caseína α_1 e caseína β	YFPF	Opióide	Rokka et al, 1997
	AVPYPQR	Hipotensora	
	TTMPLW	Imunoestimulante	
Caseína β	KVLPVPE	Hipotensora	Maeno et al, 1996
Proteínas do soro	YP	Hipotensora	Yamamoto et al, 1999
Caseína β e caseína κ	Diversos fragmentos	Hipotensora	Gobbetti et al, 2000
Caseína κ	ARHPHPLSFM	Antioxidante	Kudoh et al, 2001
Caseína β	DKLHPF	Hipotensora	Hernández-Ledesma et al, 2004
	YQEPVL		
	VKEAMAPK	Antioxidante	
Caseína β	SKVYFPFGPI	Hipotensora	Ashar & Chand, 2004
Caseína β	SKVYP	Hipotensora	Ashar & Chand, 2004

Fonte: Modificado a partir de Korhonen & Pihlanto, 2006.

Diversos estudos têm sido realizados tratando de peptídeos extraídos de proteínas provenientes de derivados do leite, inclusive queijos. Uma grande variedade de PBA é originada durante as etapas de fabricação de queijos, sendo gerados ou mantidos neste derivado durante o período de cozimento ou maturação, podendo até mesmo ser consumidos. Segundo López-Fandiño e colaboradores (2006), durante a fermentação do leite e a maturação dos queijos, as principais proteínas do leite são degradadas em um grande número de

peptídeos, devido à ação dos coagulantes adicionados, bem como enzimas de bactérias ácido-láticas.

Tabela 2. Relação das atividades biológicas de fragmentos de peptídeos de proteínas do leite, já relatados na literatura e encontrados em diferentes tipos de queijos.

Queijos	Proteína Precursora	Fragmentos da sequência	Atividade Biológica	Referências
Cheddar	Caseína α_1 / caseína β	fosfopeptídeos	Carreador de minerais	Singh et al, 1997
Mussarela, Crescenza, Itálico, Gorgonzola	Caseína β	58 a 72	Inibidores da ECA	Smacchi et al, 1998
Gouda	Caseína α_1 / caseína β	1 a 9; 60 a 68	Inibidores da ECA	Saito et al, 2000
Festivo	Caseína α_1	1 a 9; 1 a 7; 1 a 6	Inibidores da ECA	Ryhänen et al, 2001
Emmental	Caseína α_1 / caseína β	fosfopeptídeos	Imunoestimulante, carreador de minerais e antimicrobiano	Gagnaire et al, 2001
Cheddar	Caseína α_1 / caseína β	1 a 6, 1 a 7, 1 a 9, 24 a 32, e 102 a 110 / 47 a 52, e 193 a 209	Inibidores da ECA	Ong et al, 2007

Fonte: Modificado a partir de Korhonen, 2009.

5. QUEIJOS

De acordo com a regulamentação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. A denominação desse produto é reservada para aqueles derivados cuja base láctea não se constitua de gorduras ou proteínas de origem não láctea (BRASIL, 1996).

O queijo é um alimento constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas. Os minerais presentes nesse produto fazem parte da coagulação do leite, ou seja, da precipitação da caseína e o líquido que se separa do coágulo constitui o soro, que pode ser utilizado na fabricação de iogurtes, ricota, bebidas lácteas, dentre outros

(PERRY, 2004). Os queijos são classificados com base no seu teor em porcentagem de matéria-gorda no extrato seco, e no teor em porcentagem de umidade, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996).

O processo de fabricação dos queijos é constituído, basicamente, pelas etapas de coagulação do leite, pela qual se obtém a coalhada; corte da coalhada para liberação do soro; a colocação da massa resultante em formas, podendo ser prensada ou não, dependendo do tipo de queijo; e a salga. O processo de coagulação do leite depende de temperatura, que deve estar em torno de 40°C, do pH, que deve ser de 4,5 (ponto isoelétrico da proteína), e do teor de cálcio do leite. O coalho utilizado para coagulação da caseína do leite é geralmente de origem animal e age hidrolisando ligações peptídicas da caseína, transformando-a em paracaseína que precipita na presença de íons Ca^{+2} , formando a coalhada. O processo de salga dos queijos provoca a perda parcial de umidade que carrega também proteínas do soro, ácido láctico e minerais dissolvidos, à medida que o cloreto de sódio é absorvido (PERRY, 2004).

6. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS TIPOS DE QUEIJOS

-Coalho: É obtido pela coagulação do leite (padronizado ou integral pasteurizado) por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas. O queijo de coalho é um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresenta um teor de gordura nos sólidos totais que varia de 35% a 60% (BRASIL, 2001).

-Minas frescal: É o queijo fresco obtido pela coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco. Constitui-se de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada (BRASIL, 2004 e BRASIL, 1997a).

-Minas meia cura: Conforme o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952), esse queijo possui as características do queijo Minas padrão, o qual é obtido do leite integral ou padronizado, pasteurizado, não cozido, prensado mecanicamente e maturado sob condições específicas durante 20 dias.

-Mussarela: É o produto obtido pela coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, a partir da qual se obtém uma massa acidificada, que passa por um processo de filagem em banho de água quente (semi-cozida), seguido da salga, estabilização e

maturação por no mínimo 24 horas. É classificado como sendo um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extra-gordo, gordo a semi-gordo (BRASIL, 1997b).

-Parmesão: É obtido pela coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas, e se constitui em uma massa cozida, dessorada, prensada, salgada e maturada (o tempo de maturação é em torno de 240 dias). O queijo parmesão é classificado como um queijo de baixa umidade e semi-gordo (BRASIL, 1997c).

-Prato: É um queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, classificado como sendo um queijo gordo, de média umidade. Se constitui em uma massa semi-cozida, pré-prensada, moldada, prensada, salgada e maturada por um período de 25 dias, pelo menos (BRASIL, 1997d).

-Provolone: Conforme o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952), há dois tipos: provolone fresco e provolone curado. O “fresco” consiste em uma massa filada, não prensada, obtida a partir do leite pasteurizado, e dada ao consumo até 20 dias a contar da data de fabricação, apresentando características sensoriais idênticas às do queijo tipo mussarela. O “curado” consiste em uma massa obtida a partir do leite cru ou pasteurizado, enformada ou não, não prensada e devidamente maturada pelo espaço mínimo de 60 dias.

-Requeijão de corte: Corresponde a um tipo de requeijão, o qual pode é denominado “requeijão de manteiga” ou “requeijão do Norte”. O requeijão é produzido a partir da fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*, podendo ser adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias. O requeijão de manteiga é produzido a partir da fusão prolongada com agitação de uma mistura de manteiga e massa de coalhada de leite integral, semidesnatado ou desnatado (BRASIL, 1997e).

7. PBA EXTRAÍDOS DE DIFERENTES TIPOS DE QUEIJOS

Peptídeos com ação hipotensora, inibidores da ECA, foram obtidos de queijos italianos produzidos com diferentes métodos, como a mussarela, o Itálico, o Crescenza e o Gorgonzola, a partir da ação de endopeptidases de bactérias ácido-lácticas e proteinases de *Pseudomonas fluorescens* (SMACCHI & GOBBETTI, 1998). O conteúdo protéico do queijo

Edam com baixo teor de gordura foi analisado e determinado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e o estudo mostrou que a quantidade total de peptídeos aumentou conforme a maturação do queijo, com um considerável aumento da quantidade de peptídeos hidrofóbicos (KUCUKONER & HAQUE, 1997). Dois peptídeos com ação opióide agonista (β -casomorfina-5 e β -casomorfina-7) e três com atividade antagonista (casoxina-6, casoxina-C e lactoferroxina-A) foram isolados de três queijos semi-duros (Edamski, Gouda e Kasztelan) e de dois queijos maturados (Brie e Rokpol). O estudo mostrou grande quantidade de β -casomorfina nos queijos maturados, e grandes quantidades dos peptídeos opióides com atividade antagonista foram identificadas nos queijos semi-duros, sendo que a atividade opióide desses queijos foi confirmada com testes em ratos (SIENKIEWICZ-SZLAPKA et al, 2009).

8. APLICAÇÕES DOS PBA

Conferindo as diversas propriedades que os PBA possuem no organismo, influenciando nos processos fisiológicos do corpo, a curiosidade no meio científico tem sido estimulante para desvendar peptídeos bioativos, a partir de alimentos protéicos. Se os referidos peptídeos não podem ser disponibilizados em condições fisiológicas *in vivo*, eles podem ser produzidos comercialmente e utilizados como ingredientes em alimentos funcionais. Alimentos funcionais são aqueles que possuem em sua composição alguma substância biologicamente ativa e que, ao ser incorporado a uma dieta usual, provoca efeitos metabólicos e fisiológicos, desencadeando benefícios a saúde e a prevenção de doenças (ANJO, 2004). Além disso, alguns peptídeos como os inibidores da ECA e os imunostimulantes são promissores para a aplicação em formulações na alimentação animal, promovendo benefícios à saúde de forma mais direcionada. De modo geral, os PBA despertam interesse tanto no âmbito das formulações farmacêuticas, como na produção de suplementos alimentares, a fim de reduzir os riscos de doenças ou melhorar certas funções fisiológicas (SRINIVAS & PRAKASH, 2010).

PBA podem ser separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e caracterizados quanto à composição molecular por espectrometria de massa (SRINIVAS & PRAKASH, 2010). Entretanto, para algumas abordagens que envolvam a distinção entre tipos de amostras, também é possível a investigação direta por espectrometria de massa. Deste modo, é possível estabelecer correlações entre duas ou mais amostras com relação aos perfis moleculares sob investigação (HERRERO et al, 2011).

9. ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa (MS) é uma metodologia analítica muito utilizada na atualidade nas áreas de ciências biológicas, biomédicas e tecnológicas, por se tratar de uma técnica capaz de determinar a massa molecular de diversas biomoléculas, como as proteínas, com acurácia e precisão de forma relativamente rápida. Além disso, permite a fragmentação de peptídeos ionizados, possibilitando a caracterização da estrutura primária de uma proteína, a discriminação de peptídeos e a identificação de proteínas (FERREIRA et al, 2009).

O espectrômetro de massa é constituído por um sistema de ionização, pelo qual biomoléculas são vaporizadas e carregadas eletricamente; por um analisador de massas, que discrimina as biomoléculas ionizadas ou íons de acordo com a sua massa molecular; e por um detector. Uma das técnicas mais avançadas da MS, na atualidade, é a dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI), que permite a identificação e o mapeamento de proteínas. MALDI consiste em uma técnica de ionização baseada na dessorção a laser e, por meio desta, as proteínas em estudo são misturadas a uma matriz ácida, que transfere prótons para as moléculas de proteína, e são irradiadas com um feixe de laser, o que provoca a dessorção das moléculas (proteína + matriz), modificando-as para o estado gasoso. Essa condição de ionizada e de gás é requisito para que as moléculas possam ser analisadas pela MS (CUNHA et al, 2006).

O analisador de massas TOF ou tempo de voo (*time-of-flight*) é o sistema mais comumente associado à técnica de MALDI e determina a massa das moléculas baseado em seu tempo de voo. Por meio desse sistema, as moléculas ionizadas são aceleradas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico, sendo mensurado o seu tempo de voo até o detector. O tempo será proporcional à massa molecular (CUNHA et al, 2006).

As informações adquiridas, por meio das análises pela MS, são processadas em um software, o qual gera espectros que permitem a análise de tais informações. Os espectros consistem em uma representação gráfica que relaciona a intensidade de radiação transmitida, absorvida ou refletida pelos íons, em função da razão massa/carga (m/z) desses íons. Picos que representam a intensidade dos íons são apresentados no eixo y, e a razão m/z é apresentada no eixo x. Os requisitos para a aquisição de espectros com alto conteúdo de informação consistem na resolução, acurácia e sensibilidade do espectrômetro de massa. A resolução permite que íons distintos (picos) sejam bem diferenciados em um espectro; a acurácia consiste no grau de certeza que o equipamento fornece ao distinguir massas

moleculares diferentes; e a sensibilidade confere a probabilidade estatística de um íon ser detectado e mostrado no espectro (SANTOS, 2008; CHERNUSHEVICH et al, 2001).

Estudos que envolvem o sequenciamento de proteínas podem ser realizados utilizando-se metodologias conjugadas, ou seja, espectrômetros associados a dois analisadores de massa como, por exemplo, o MALDI-TOF/TOF. Nesse caso, utiliza-se um método denominado MALDI-LIFT-TOF/TOF para a aquisição de fragmentos de um íon (peptídeo ionizado). Existem dois modos do método LIFT-TOF/TOF, o primeiro é o CID-LIFT, pelo qual o peptídeo de interesse, ou íon, é acelerado em uma câmara de colisão, onde se depara com uma corrente gasosa de um gás inerte, como o nitrogênio ou o argônio, e as colisões entre o gás e o íon provocam a fragmentação do mesmo; o outro método é o LID-LIFT, o qual utiliza o chamado laser de decomposição induzida, que é independente da colisão com um gás. A partir da utilização do método LIFT para fragmentação de íons, os espectros gerados apresentarão as informações relacionadas à sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo em estudo (CUNHA et al, 2006; SUCKAU et al, 2002).

A MS permite identificar uma determinada proteína por meio de diferentes métodos. Dentre esses métodos há a Impressão Digital do Mapa Peptídico, pelo qual é possível reconhecer uma proteína, utilizando como base um banco de dados, sem ser necessário sequenciar toda a proteína em estudo. Portanto, a Impressão Digital do Mapa Peptídico é um método utilizado para identificar proteínas com genomas pequenos, totalmente sequenciados e determinados em banco de dados. Sendo assim, para a identificação confiável de proteínas cujo genoma não está completamente sequenciado, é necessária a utilização de fragmentos da proteína e, para tal, o equipamento do tipo MALDI-TOF-TOF, descrito anteriormente, é o mais indicado, sendo esta modalidade de interpretação denominada sequenciamento *De novo* (CUNHA et al, 2006).

Após a descrição da importância da técnica de MS nas pesquisas da área de proteômica, considerando que há um crescente interesse por parte da indústria farmacêutica e alimentícia na identificação de PBA e, considerando o leite como a principal fonte alimentar dessas moléculas, há necessidade de investimentos progressivos em estudos que envolvem a caracterização dos peptídeos provenientes do leite e de seus derivados. Além disso, a maior parte dos estudos envolvendo PBA descritos em queijos é oriunda de tipos encontrados apenas no exterior, sendo seu consumo de pouca relevância para população brasileira.

O presente estudo teve como objetivo a extração de peptídeos de diferentes tipos de queijos, comumente consumidos no Brasil, utilizando solventes polar e apolar, a fim de

caracterizá-los objetivando a comparação entre os diferentes tipos de queijos, utilizando-se da espectrometria de massa como estratégia para distinção dos mesmos, e de métodos estatísticos, para agrupá-los, o que pode funcionar como subsídio para a identificação de adulteração nos processos de produção dos queijos; e por fim, sequenciar peptídeos e identificar suas potenciais funções biológicas, utilizando como base os peptídeos biologicamente ativos já referidos na literatura científica.

10. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Extrair, caracterizar e identificar peptídeos de diferentes tipos de queijos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair peptídeos de diferentes tipos de queijos utilizando solventes polar e apolar;
- Determinar as massas moleculares dos peptídeos utilizando uma metodologia de espectrometria de massa;
- Comparar os diferentes tipos de queijos utilizando os dados de espectrometria de massa por meio de uma técnica de estatística multivariada como estratégia para distinção;
- Sequenciar fragmentos de peptídeos e determinar as potenciais funções biológicas, com base em sequências de peptídeos bioativos de bancos de dados.

11. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de amostras

As amostras de queijos foram adquiridas em uma feira comercial localizada no Guará II - Distrito Federal (DF), no mês de outubro de 2011. A amostragem foi separada em microtubos de polipropileno de 2,0 mL e constituiu-se de queijo minas meia cura, requeijão de corte, queijo provolone, queijo parmesão, queijo coalho, queijo prato, queijo minas frescal e queijo mussarela.

Extração dos Peptídeos

Cada produto obtido foi separado em três microtubos tipo eppendorf (tubo 1, tubo 2 e tubo 3), cada um contendo 100 mg da amostra, pesados em balança analítica digital (Figura 1). Em seguida, foram preparadas três soluções diferentes de 500 μ L para cada tubo: solução com água Milli-Q, solução com acetonitrila (ACN), e solução com 50% de água Milli-Q e 50% de ACN.

A água Milli-Q constitui-se em um solvente filtrado em escala nanométrica, que é capaz de extrair preferencialmente os peptídeos hidrofílicos, enquanto a ACN é um solvente capaz de extrair preferencialmente os peptídeos hidrofóbicos.

Em cada tubo foram adicionados 20 μ L de ácido trifluoracético (TFA), que acidifica a solução, facilitando o processo de ionização dos peptídeos. As amostras foram homogeneizadas com pistilo cônico de polipropileno com 20 movimentos circulares. Em seguida, as soluções foram incubadas por um período total de aproximadamente 20 horas, em constante agitação, a 100 rpm e temperatura média de 22°C, sendo que após 12 horas de incubação foram homogeneizadas em vortex, e incubadas novamente (Figura 2).



Figura 1. Foto: Luciano Paulino da Silva, EMBRAPA-CENARGEN, DF. Balança analítica digital utilizada para pesar as amostras de queijos.



Figura 2. Foto: Luciano Paulino da Silva, EMBRAPA-CENARGEN, DF. Incubadora/Agitadora e vortex, respectivamente, utilizados para homogeneização das amostras durante o processo de extração de peptídeos.

Após incubação, as soluções foram centrifugadas a 13.400 rpm, por 10 minutos, para separar a amostra sólida, do sobrenadante constituído principalmente por biomoléculas em solução. Duzentos μL do sobrenadante de cada microtubo foram recuperados com pipeta e colocados em novos microtubos, equivalendo às respectivas amostras. Os novos microtubos contendo o sobrenadante foram congelados em nitrogênio líquido e imediatamente dispostos em equipamento liofilizador “Speed Vac” (Figura 3), por um período médio de 3 horas. O liofilizador permite a sublimação das substâncias utilizadas na preparação das soluções (água Milli-Q e ACN), produzindo um pó esbranquiçado, constituído de biomoléculas, em particular, peptídeos e proteínas.



Figura 3. Foto: Luciano Paulino da Silva, EMBRAPA-CENARGEN, DF. Equipamento liofilizador tipo “Speed Vac”.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 100 μL de água Milli-Q, homogeneizadas em Vortex, e centrifugadas a velocidade de 13.400 rpm, por 60 segundos, separando componentes não dissolvidos para o fundo do microtubo. Utilizou-se um μL de sobrenadante de cada amostra, dessa vez, constituído basicamente de peptídeos.

Preparação da placa para análise no espectrômetro de massa MALDI-TOF e TOF/TOF

A matriz utilizada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), que é o mais comum em protocolos de preparação de amostras para análise em MALDI. A solução da matriz foi preparada adicionando-se 250 μL de ACN, 200 μL de água Milli-Q e 50 μL de TFA (à concentração de 3%), necessariamente nesta ordem, a 5 mg de CHCA. Em seguida, a mistura resultante foi homogeneizada em vortex.

Para a preparação da placa que contém as amostras peptídicas inseridas no espectrômetro de massa, foram dissolvidos os 3 μL da matriz em 1 μL de cada amostra sobre um papel filme e a solução resultante foi depositada em triplicata na placa ($\sim 0,5$ - $1,0$ μL por poço), como demonstrado na Figura 4.

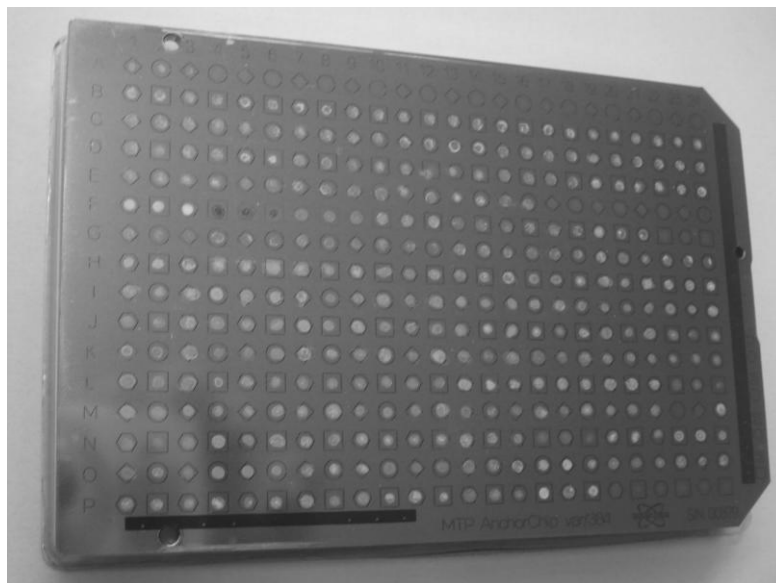


Figura 4. Placa demonstrando a disposição das amostras a serem avaliadas pelo MALDI-TOF e TOF/TOF. Cada três poços consecutivos mostrados na placa equivalem a um tipo de amostra.

Esperou-se a secagem da amostra na placa e procedeu-se a análise pelo MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Alemanha). A metodologia utilizada para as análises foi configurada no modo automático, refletido positivo (RP 900-4500 Da), para uma faixa de detecção de m/z 600 a 5000 e com detecção de componentes apresentando resolução superior a 3000. O modo automático foi determinado a realizar 5000 disparos de laser em cada amostra sendo 250 disparos em cada área diferente da amostra. Nos casos em que ocorressem 50 repetições de disparos falhas, o equipamento abandonaria a aquisição da amostra. O modo de calibração utilizado foi o de calibração externa por meio da lista denominada *Peptide Calibration Standard Mono* utilizando uma mistura de peptídeos cujas massas moleculares são conhecidas (*Peptide Calibration Standard Mixture I*, Bruker, Alemanha). Para a fragmentação dos peptídeos, foi utilizado o modo LIFTTM. O modo MS/MS foi empregado para a fragmentação de um íon específico detectado e que já foi previamente descrito na literatura.

Para a análise estatística dos espectros adquiridos foi utilizado o método MALDI Biotyper, gerando-se dendrogramas no modo hierárquico e com medida de distância Euclideana. Esta abordagem estatística visa à comparação entre os tipos de queijos por meio da formação de grupos.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peptídeos hidrofóbicos na faixa de m/z 600 a 3700, extraídos pela ACN, podem ser observados pelo espectro na Figura 5, bem como os peptídeos mais hidrofílicos, extraídos pela água, na faixa de m/z 600 a 4500 podem ser identificados no espectro da Figura 6. Os íons de m/z 1881,2 e 2763,7 foram identificados em quase todos os tipos de queijos, alguns somente no solvente apolar, outros no solvente polar, ou ambos, sendo caracterizados como típicos de proteínas do leite. Considerando que o íon de m/z 1881,2 pôde ser observado em todas as extrações com os diferentes solventes, o mesmo foi considerado como tendo, possivelmente, caráter anfipático.

A comparação entre os espectros da Figura 5 e da Figura 6 permite constatar que o queijo tipo parmesão é pobre em peptídeos hidrofóbicos, e é constituído por maior abundância de peptídeos hidrofílicos. Constata-se também que o queijo tipo mussarela apresenta maior abundância de peptídeos com caráter hidrofóbico. Peptídeos hidrofílicos com m/z acima de 4000 podem ser observados na Figura 6, somente para os queijos tipo coalho e requeijão de corte.

A extração pela solução de ACN e H_2O (Figura 7) permitiu a extração de íons de caráter tanto hidrofílico, como os de caráter hidrofóbico, porém eventos de supressão de sinal de alguns íons em relação a outros podem ter impedido o aparecimento de todos os peptídeos presentes nas amostras, pois não houve a utilização prévia de técnicas de separação, como a cromatografia.

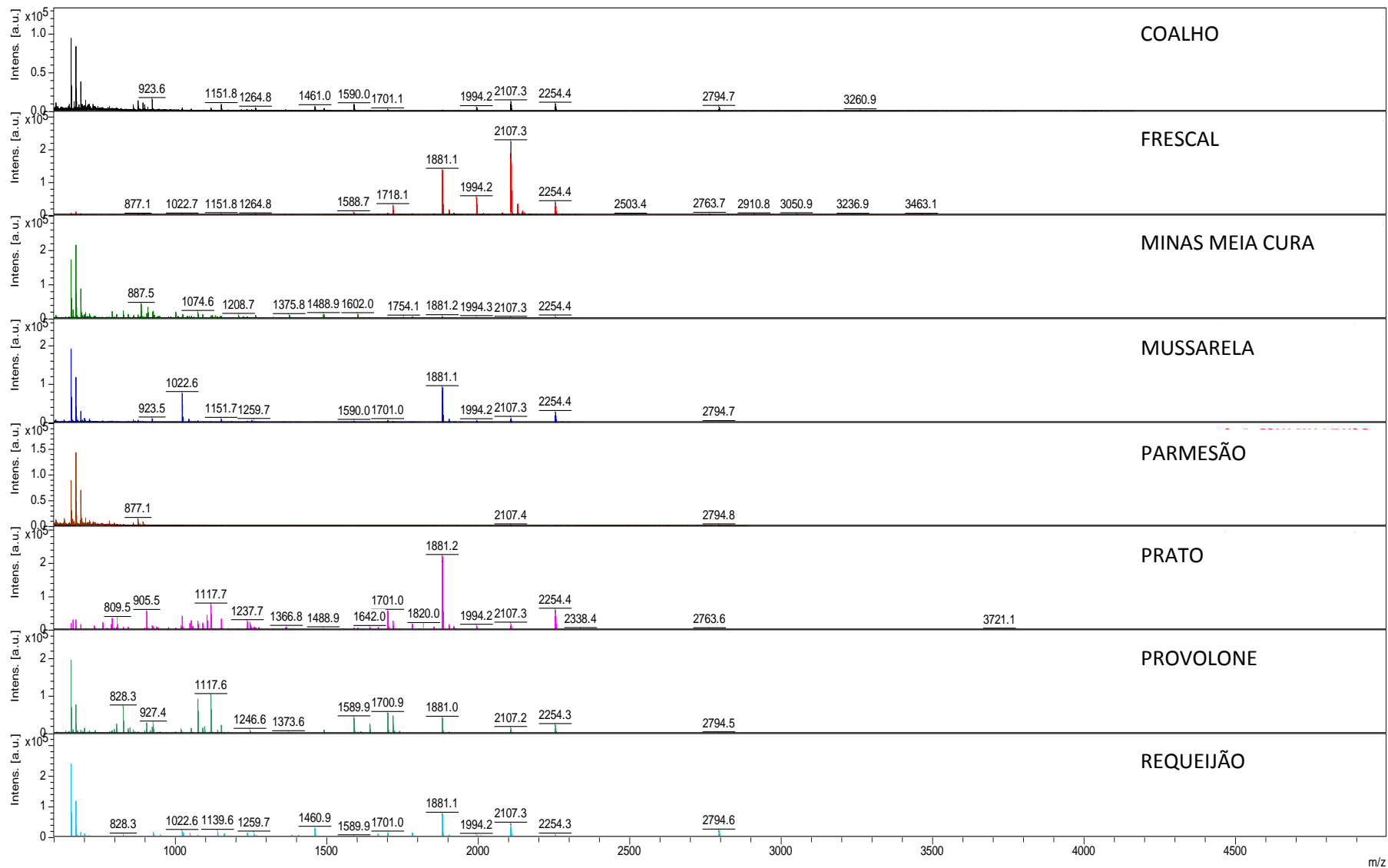


Figura 5. Espectros de massa MALDI-TOF identificando as razões m/z dos íons peptídicos hidrofóbicos, que foram extraídos por ACN a partir dos diferentes tipos de queijos.

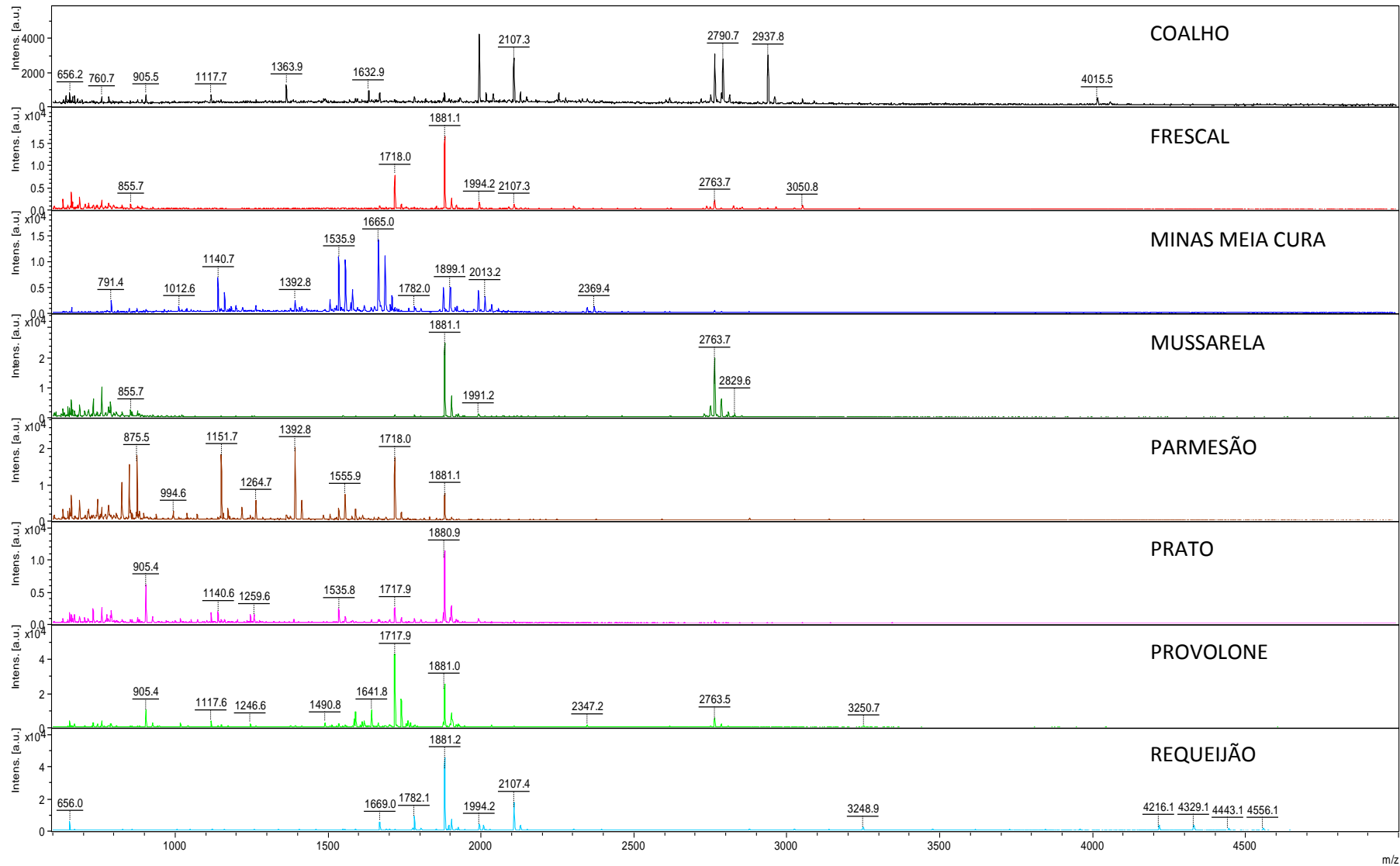


Figura 6. Espectros de massa MALDI-TOF identificando as razões m/z dos íons peptídicos hidrofílicos, que foram extraídos por H₂O a partir dos diferentes tipos de queijos.

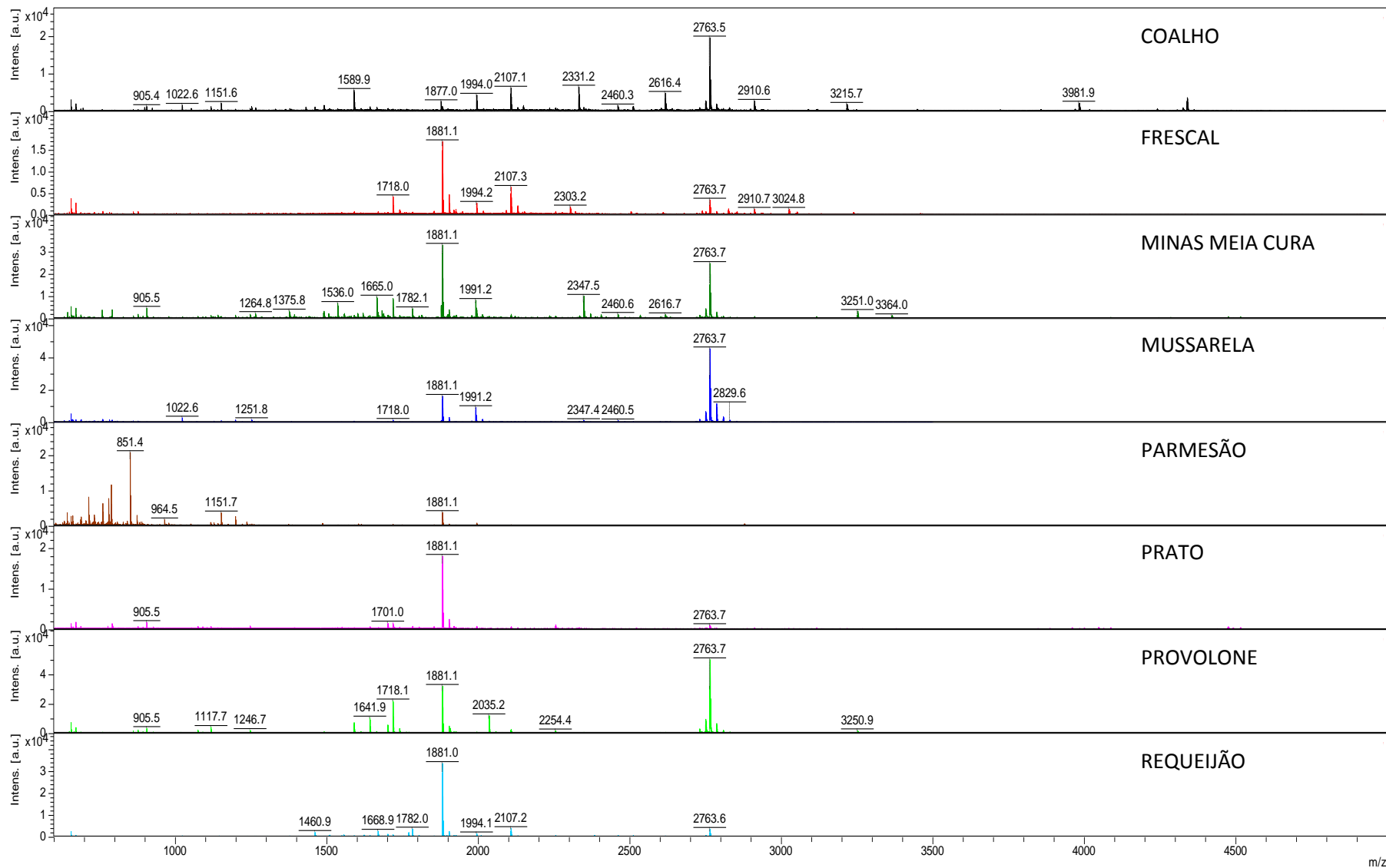


Figura 7. Espectros de massa MALDI-TOF identificando as razões m/z dos íons peptídicos hidrofílicos e hidrofóbicos, que foram extraídos por H₂O e ACN a partir dos diferentes tipos de queijos.

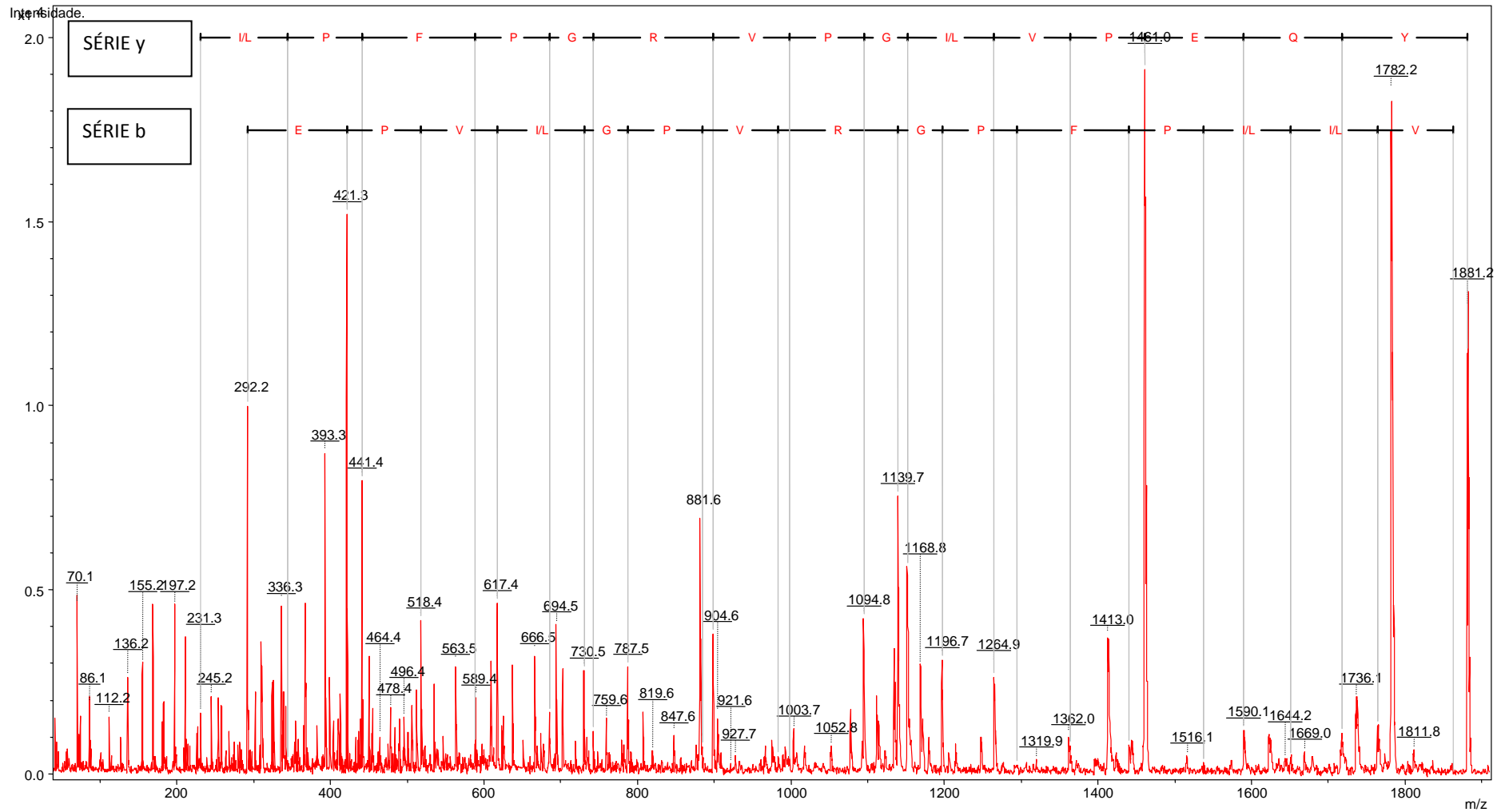


Figura 8. Espectro de massa obtido pelo modo MS/MS (LIFT), que possibilitou a fragmentação do peptídeo precursor 1881,2 Da (à direita). Os íons à esquerda representam os fragmentos do íon precursor. As letras relacionadas, logo acima na figura, são os resíduos de aminoácidos identificados de acordo com as diferenças entre as suas massas moleculares. A série y identifica os aminoácidos da região N terminal para a região C terminal da proteína (sentido direita para a esquerda), enquanto o contrário ocorre na série b, a qual termina a uma diferença de massa de 18 Da a partir do íon precursor.

O íon de m/z 1881,2 foi fragmentado e a sua sequência de aminoácidos foi determinada, conforme apresentado na Figura 8, permitindo a equiparação da sequência adquirida com dados da literatura. Rossano e colaboradores (2005) relataram que este peptídeo corresponde ao fragmento de resíduos de aminoácidos 193-209 da caseína β , e é produzido nos queijos pela ação da quimosina sobre a caseína β , sendo o seu acúmulo associado ao amargor dos queijos. Piraino e colaboradores (2007) realizaram um estudo com diferentes queijos europeus, dentre eles o *Camembert*, *Stilton*, Edam, *Cheddar*, entre outros, utilizando metodologia semelhante com a espectrometria de massa por MALDI, e observaram que a presença do íon m/z 1881,2 foi muito frequente dentre os queijos avaliados, especialmente o queijo cheddar. Alguns bancos de dados revelam as atividades biológicas de fragmentos desse peptídeo como atividade hipotensora (fragmentos 193-198 e 199-204 da caseína β) e a antimicrobiana (fragmento 193-209 da caseína β).

O íon de m/z 2763,7 também foi identificado com frequência, sendo a sua presença observada em todos os queijos, exceto o parmesão. A presença desse peptídeo já foi relatada nos queijos tipo Edam, *Cooleeney*, *Port du Salut*, *Parmigiano-Reggiano*, Suíço, *Gruyere*, *Camembert* e *Cheddar*, sendo um fragmento da caseína α_1 . Esse fragmento é geralmente produzido a partir da hidrólise da caseína por peptidases de microrganismos *starters* (PIRAINO et al, 2007). *Starters* são microrganismos ativos ou latentes que ao serem incorporados em certos alimentos, conferem características desejáveis ao produto final (CAMPAGNOL, 2007).

O íon de m/z 1717,9 detectado no queijo provolone, bem como o íon de m/z 1151,6, detectado nos queijos coalho e parmesão já foram relatados como sendo fragmentos de caseína β (194-209 e 199-209, respectivamente) e identificados em queijos produzidos com extrato de *Munida*, uma proteinase produzida por um crustáceo do gênero *Munida* (ROSSANO et al, 2005).

O íon de m/z 1668,9 foi identificado somente no requeijão de corte e corresponde ao fragmento 192-206 da caseína β . Piraino e colaboradores (2007) relataram a sua presença no queijo *Stilton*.

A análise estatística possibilitou o agrupamento dos queijos com base em suas características moleculares. A partir disso, foram configurados dendrogramas que permitiram a visualização desses agrupamentos. A Figura 9, representando a extração por ACN, mostra que os queijos Minas frescal e requeijão são semelhantes a nível molecular por possuírem peptídeos hidrofóbicos em comum, o mesmo ocorrendo com os queijos prato e mussarela. O

queijo provolone apresentou similaridade molecular com os queijos prato e mussarela, também pela presença comum de peptídeos hidrofóbicos. Além de suas características moleculares, o processo de produção dos queijos provolone e mussarela são semelhantes devido ao processo de filagem e semi cozimento a que são submetidos, o que pode influenciar na composição molecular desses queijos, tornando-os similares sob o ponto de vista de sua constituição peptídica, sugerindo que a temperatura e a manipulação durante a produção desses queijos influenciam em sua composição protéica. Segundo López-Fandiño e colaboradores (2006), a origem do leite, bem como as condições de manufatura dos queijos afetam a produção de peptídeos. Korhonen (2009) afirma que proteólises secundárias durante a maturação de queijos podem conduzir a formação de outros peptídeos bioativos, sendo sua ocorrência dependente do estágio de maturação. O queijo coalho apresentou proximidade molecular principalmente com os queijos frescal e requeijão.

O dendrograma que apresenta os agrupamentos entre queijos cujos peptídeos foram extraídos por ACN/H₂O, define uma maior proximidade entre os queijos provolone e mussarela, mais uma vez, confirmando que a similaridade entre ambos, com base em sua composição peptídica (Figura 11). Tanto no dendrograma de ACN (Figura 9), como no ACN/H₂O, o queijo parmesão se manteve externo a todos os demais queijos, o que indica que o mesmo possui características distintas dos demais, sendo este evento hipoteticamente explicado pela pouca quantidade de peptídeos hidrofóbicos que possui.

Pode-se observar, pelo dendrograma de H₂O (Figura 10), que o queijo parmesão apresentou certa familiaridade em nível molecular com os queijos Minas frescal e Minas meia cura, o que também pôde ser observado nos espectros cromatográficos dos peptídeos extraídos com água, mostrados na Figura 6, em que se observa a equivalência da maioria dos íons detectados nos três queijos.

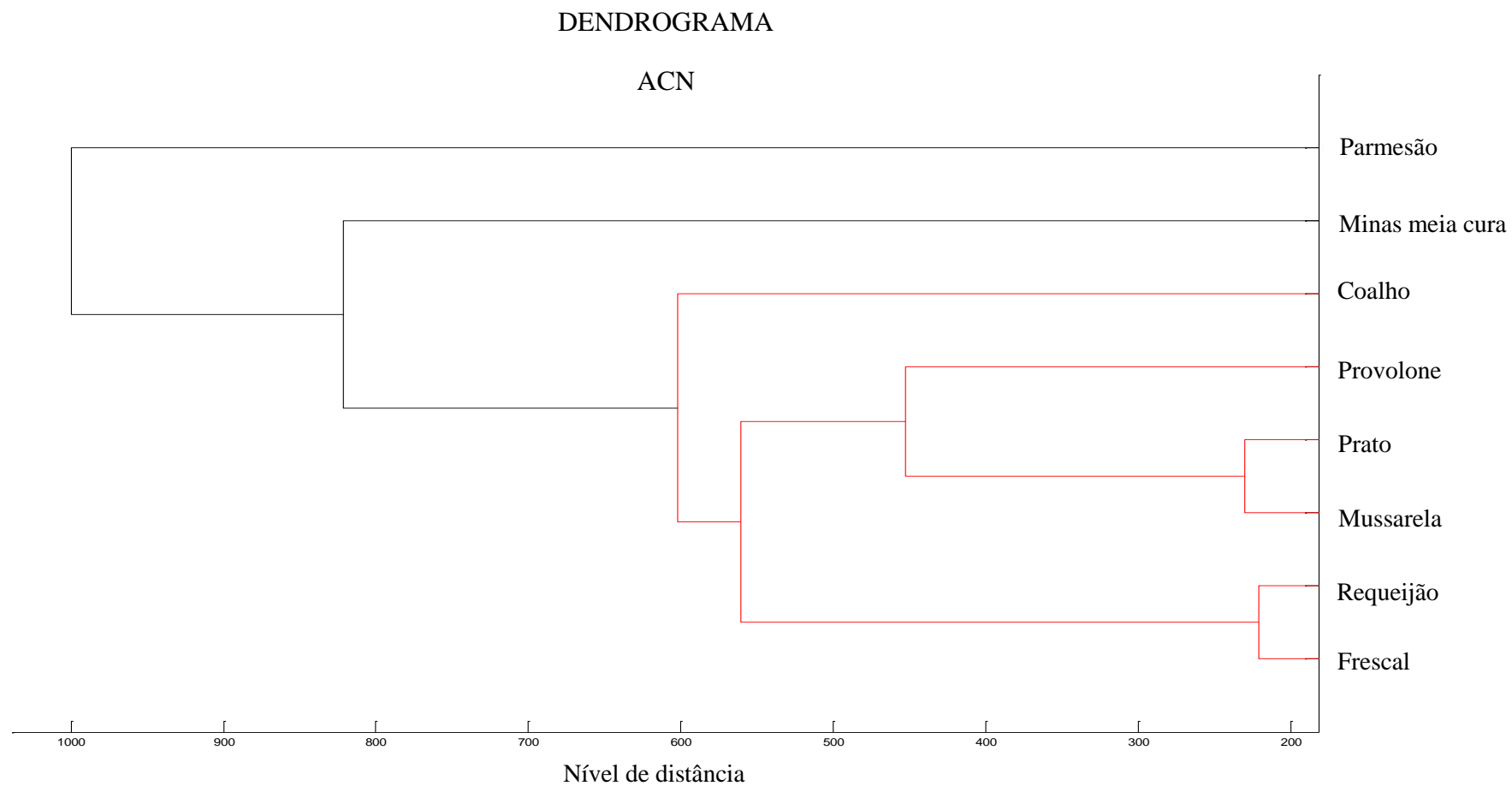


Figura 9. Representação dos queijos cujos peptídeos foram extraídos pela solução de ACN, agrupados com base em suas características moleculares utilizando estratégia de discriminação estatística por meio de análise hierárquica de agrupamentos e distância Euclideana.

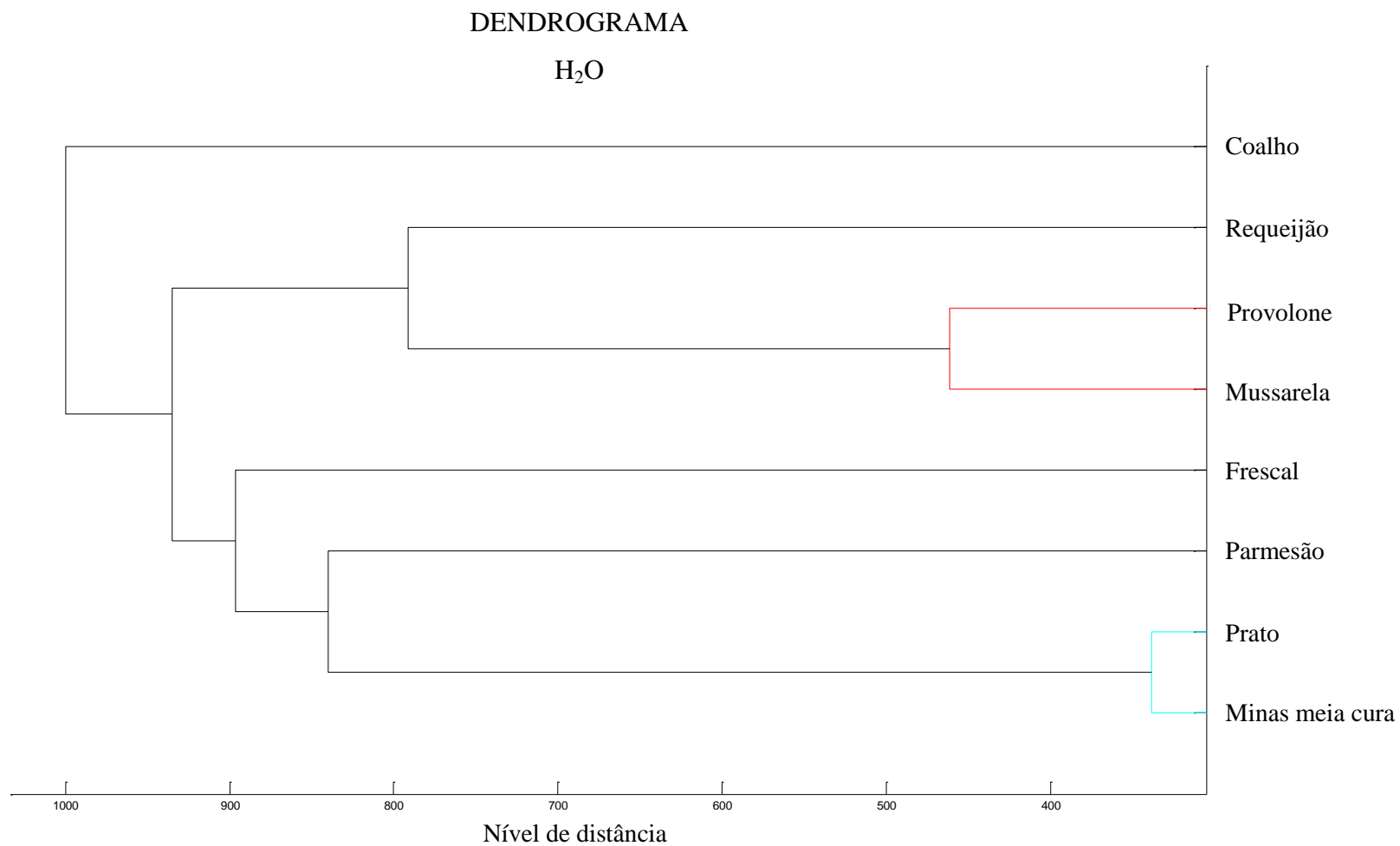


Figura 10. Representação dos queijos cujos peptídeos foram extraídos pela solução de H₂O, agrupados com base em suas características moleculares utilizando estratégia de discriminação estatística por meio de análise hierárquica de agrupamentos e distância Euclideana.

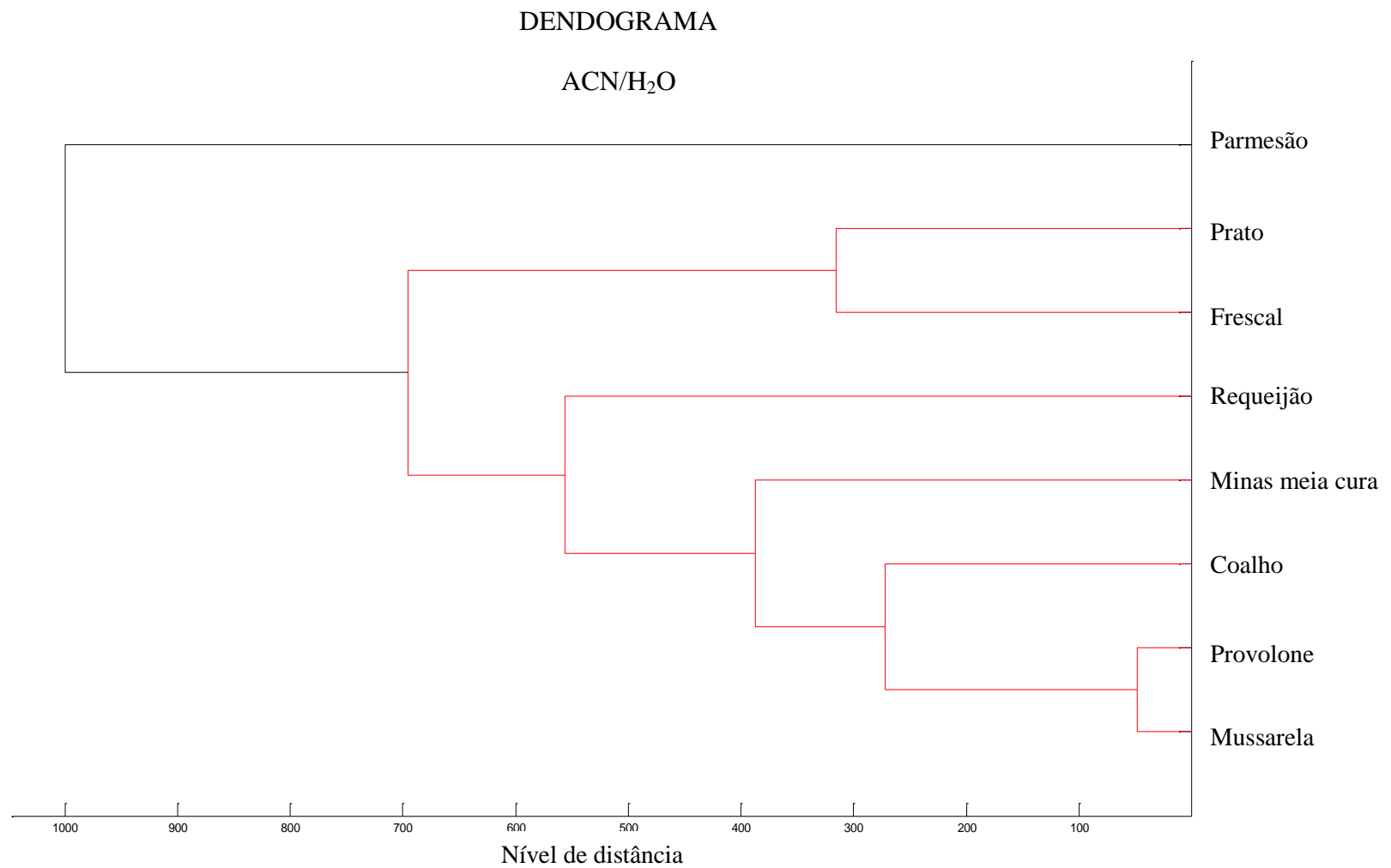


Figura 11. Representação dos queijos cujos peptídeos foram extraídos pela solução de ACN/H₂O, agrupados com base em suas características moleculares utilizando estratégia de discriminação estatística por meio de análise hierárquica de agrupamentos e distância Euclidiana.

13. CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou a correlação dos dados que foram obtidos com fontes literárias, as quais permitiram a identificação da proteína de origem dos peptídeos extraídos, já descritos como sendo resíduos de proteínas de origem láctea.

Foi possível o agrupamento dos diferentes queijos levando em consideração as suas características moleculares, tanto no que tange aos parâmetros de massa, como as propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos, que podem ter caráter hidrofóbico, hidrofílico ou anfipático.

A utilização da metodologia de espectrometria de massa associada à análise estatística multivariada permitiu comparar diferentes tipos de queijos, bem como já tem sido descrito na literatura, porém com uma abordagem diferente, sem a utilização prévia da metodologia de cromatografia para separação dos peptídeos, o que tornou o estudo mais rápido, obtendo-se informações de forma precisa e eficaz, e utilizando-se uma amostragem de queijos que são mais comumente consumidos no Brasil.

14. PERSPECTIVAS

Considerando o crescente interesse na área de proteômica e a modernização de metodologias que propiciam estudos precisos e acurados, perspectivas induzem a se pensar na utilização da presente abordagem como um método para aquisição de certificações e identificação de queijos, ao se ter o conhecimento das proteínas que tipificam um determinado queijo, e a partir da utilização de metodologias estatísticas que propiciem a distinção diferentes tipos desse derivado lácteo, no que tange as suas características moleculares. Além disso, estudos mais aprofundados poderiam permitir a validação da certificação geográfica, considerando que a autenticação da origem de determinado queijo seria realizada utilizando-se uma abordagem de caracterização molecular, como a espectrometria de massa.

15. REFERÊNCIAS

ANJO, D. F. C. Alimentos Funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Journal Vasc Br*, vol 3, nº 2, p. 145-154, 2004.

ANTUNES, A. J. Proteínas do leite. In: *Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino*. São Paulo: Manole, p.32-33, 2003.

ARIHARA, K.; NAKASHIMA, Y.; MUKAI, T.; ISHIKAWA, S.; ITOH, M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, vol. 57, nº 3, p. 319-324, 2000.

BRASIL. Regulamento os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos produtos lácteos. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996.

BRASIL a. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997.

BRASIL b. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella). In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997.

BRASIL c. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 353, de 04 de setembro de 1997.

BRASIL d. Fixação de identidade e qualidade do queijo prato. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997.

BRASIL. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001.

BRASIL e. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesõn. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 359 de 04 de novembro de 1997.

BRASIL. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto 30691, de 07 de julho de 1952.

BRASIL. Altera a Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. In: Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4 de 05 de março de 2004.

CAMPAGNOL, P. C. B. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. Dissertação de Mestrado, Santa Maria, RS, Brasil, 2007.

CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrom.* Vol 36, p. 849-865, 2001.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas – o papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* ano IX, nº 36, p. 40-46, 2006.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, J. S.; SANVIDO, G. B.; PERECIN, F.; CHATARINO, R. R.; SIMAS, R. C.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; JUNIOR, H. M. et. al. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. *Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP, 2009.*

FUJITA, H., YAMAGAMI, T., OHSHIMA, K. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition Research*, vol.21, p.1149-1158, 2001.

GILL, H. S.; DOULL, F.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L. Immunoregulatory peptides in bovine Milk. *British Journal of Nutrition*, vol. 84, Suppl. 1, S111±S117, 2000.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, 2008. Disponível em: <<http://www.vitafor.com.br/artigos/wheyprotein.PDF>> Acesso em: 15 ago 2011.

HERRERO, M.; SIMÓ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrometry Reviews*. doi: 10.1002/mas.20335. 2011

KATAYAMA, K.; FUCHU, H.; SAKATA, A.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; KAWAMURA, Y.; MUGURUMA, M. Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activities of Porcine Skeletal Muscle Proteins Following Enzyme Digestion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, vol 16, nº 3, p. 417-424, 2003.

KORHONEN, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* vol. I, p. 177-187, 2009.

KORHONEN, H., PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, vol. 16, p. 945–960, 2006.

KUCUKONER, E. & HAQUE, Z. U. Peptide Profile of Low-Fat Edam Cheese. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 22, p. 449-452, 1997.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OTTE, J.; VAN CAMP, J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, vol.16, p. 1277–1293, 2006.

MEISEL, H. Overview on Milk Protein-derived Peptides. *Int. Dairy Journal*, vol. 8, p. 363-373, 1998.

MEISEL, H. & BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* vol. 76, p.207–215, 1999.

MIGUEL, M.; RECIO, I.; GOMEZ-RUIZ, J.A.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDINO, R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, vol. 67, nº 9, p.1914-1920, 2004.

OLIVEIRA, D. S. de; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, vol. 102, nº. 561-562, p.17-22, 2007.

PARK, Y. W. Overview of Bioactive Components in Milk and Dairy Products. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwell, p. 3-12, 2009.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, vol 27, nº 2, p. 293-300, 2004.

PINHEIRO, A. J. R. & MOSQUIM, M. C. A. V. Apostila Processamento de leite de consumo. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Viçosa, 1991.

PIRAINO, P.; UPADHYAY, V. K.; ROSSANO, R.; RICCIO, P.; PARENTE, E.; KELLY, A. L.; MCSWEENEY, P.L.H. Use of mass spectrometry to characterize proteolysis in cheese. *Food Chemistry* vol. 101, p. 964–972, 2007.

ROSSANO, R.; PIRAINO, P.; D'AMBROSIO, A.; O'CONNEL, O.F.; UNGARO, N.; MCSWEENEY, P.L.H.; RICCIO, P. Proteolysis in miniature cheddar-type cheeses manufactured using extracts from the crustacean *Munida* as coagulant. *Journal of Biotechnology*, vol. 120, p. 220–227, 2005.

SAIGA, A.; OKUMURA, T.; MAKIHARA, T.; KATSUTA, S.; SHIMIZU, T.; YAMADA, R.; NISHIMURA, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*, vol. 51, nº 6, p. 1741-1745, 2003.

SANTOS, M. F. Proteoma diferencial da bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivada com plântulas de cana-de-açúcar. Rio de Janeiro: UFRJ, 2008. 108 p. (Tese Doutorado) - Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SIENKIEWICZ-SZLAPKA, E.; JARMOLOWSKA, B.; KRAWCZUK, S.; KOSTYRA, E.; KOSTYRA, H.; IWAN, M. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal*, vol. 19, p. 258–263, 2009.

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

SMACCHI, E. & GOBBETTI, M. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 22, p. 687–694, 1998.

SRINIVAS, S. & PRAKASH, V. Bioactive Peptides from Bovine Milk α -Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties. *Int J Pept Res Ther*, vol. 16, p. 7–15, 2010.

SUCKAU, D.; SCHWEIGER-HUFNAGEL, U.; RESEMANN, A.; LUBECK, M. De Novo Sequencing of Tryptic Peptides using MALDI-TOF/TOF MS and nanoESI-Ion Trap MS. 2002. Disponível em: <http://www.bruker.pl/images/stories/Daltonics/noty/mt66-lcms37.pdf>
Acesso em: 26 nov 2011.

SUETSUNA, K., MAEKAWA, K., CHEN, J. R. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 15, nº 5, p. 267-272, 2004.

WU, J. & DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.*, vol.35, p.367-375, 2002.