



Inês João Pedroso **Produção de péptidos bioactivos em leites fermentados**
Matias das Neves **simbióticos**
Luís



**Inês João Pedroso
Matias das Neves
Luís**

**Produção de péptidos bioactivos em leites fermentados
simbióticos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Especialidade Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Pereira Gomes, Professora Auxiliar da Universidade Católica Portuguesa do Porto e co-orientação da Doutora Ana Cristina Cardoso Freitas Lopes de Freitas, Professora Auxiliar do ISEIT/Viseu do Instituto Piaget e do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor José Carlos Márcia Andrade
professor auxiliar do Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte (ISCSN) da CESPUP

Doutora Ana Maria Pereira Gomes
professora auxiliar da Universidade Católica Portuguesa do Porto

Doutora Ana Cristina Cardoso Freitas Lopes de Freitas
Professora auxiliar do ISEIT do Instituto Piaget de Viseu

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores Doutora Ana Gomes, Doutora Ana Cristina Freitas e Doutor Pedro Domingues agradeço pelos ensinamentos, orientação e disponibilidade que permitiram o desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio e palavras de encorajamento que me ajudaram e incentivaram nos momentos mais difíceis.

Ao Eng.º João Mandanelo o meu agradecimento pela disponibilidade, prontidão e apoio na aquisição dos leites que foram preciosas na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório deixo o meu agradecimento pelo apoio na integração, pela transmissão de conhecimentos e apoio sem os quais este trabalho não teria sido possível, pela simpatia e boa disposição que animaram até os dias menos bons.

À Rosa um agradecimento especial por todos os bons e maus momentos por que passámos juntas durante esta jornada, pela companhia, por toda a ajuda no trabalho, por todo o apoio e incentivo nos dias difíceis, pela paciência para me aturar 24h por dia, pela amizade.

Aos amigos e à família o meu agradecimento por compreenderem a minha falta de disponibilidade, pela paciência para lidar com a minha falta de paciência, pelo apoio e estímulo.

palavras-chave

Péptidos bioactivos, probióticos, simbióticos, leite fermentado, actividade anti-hipertensiva, actividade antioxidante, espectrometria de massa

resumo

O leite é um alimento com elevado valor nutritivo, do qual se destaca a sua composição proteica rica em aminoácidos essenciais. Os lacticínios, em particular os leites fermentados, têm vindo a ser alvo de inúmeros estudos no sentido de conhecer melhor a sua matriz e avaliar as suas potencialidades ao nível da saúde humana. A utilização de novas culturas de arranque tem sido um campo largamente explorado com a introdução de probióticos no processo de produção destes lacticínios, contudo o principal foco destes estudos tem sido a obtenção de péptidos com actividade biológica. A este interesse pela obtenção de novos produtos com impacto positivo na saúde, junta-se o facto de leites de diferentes origens apresentarem diferente composição, o que tem impacto não só ao nível nutricional, mas também ao nível económico-social. Devido a estas diferenças, a valorização dos diferentes tipos de leite sob os pontos de vista já enumerados ganha ainda mais importância.

No sentido de valorizar os leites de cabra e ovelha, foram preparados leites fermentados com as estirpes probióticas *Lactobacillus casei-01*, *Lactobacillus paracasei* LAFTI[®] L26 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12. Como referência foram também preparados leites de vaca fermentados com as mesmas estirpes probióticas. Os leites fermentados produzidos foram processados de modo a obter-se fracções com pesos moleculares abaixo dos 3kDa, as quais foram testadas para determinar as actividades anti-hipertensiva e antioxidante dos diferentes leites fermentados. As fracções com actividade biológica foram posteriormente analisadas por espectrometria de massa de modo a tentar identificar os péptidos responsáveis pela actividade registada.

Os leites fermentados preparados neste trabalho não apresentaram actividade anti-hipertensiva. Contudo todos os leites apresentaram actividade antioxidante com especial destaque para os leites fermentados com os lactobacilos. Da análise por espectrometria de massa não foi possível identificar nenhum péptido responsável pela actividade biológica das amostras.

keywords

Bioactive peptides, probiotics, symbiotic, fermented milk, antihypertensive activity, antioxidant activity, mass spectrometry

abstract

Milk is a food with high nutritional value, which has a high content of essential amino acids among its proteins. Dairy products, particularly fermented milks, have been the target of numerous studies to better understand its matrix and evaluate its potential in terms of human health. The use of new starter cultures has been largely studied with the introduction of probiotics in the production of dairy products, however the main focus of these studies have been the production of peptides with biological activity. In addition to this interest for new products with positive impact on health, milk from different sources have different composition. This milk variability has an impact not only on nutrition, but also on economic and social fields. For that reason, studying different types of milk is of great significance.

In order to enhance goat and sheep milks, fermented milks with probiotic strains *Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus paracasei* LAFTI[®] L26 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 were prepared. As a standard the same probiotic milks were prepared with cow's milk. The fermented milks produced were processed in order to obtain fractions with molecular weights below 3kDa. Then, these fractions were tested to determine antihypertensive and antioxidative activities in the different milks. The biologically active fractions were posteriorly analyzed by mass spectrometry in order to identify the bioactive peptides.

The results obtained in this study didn't show any antihypertensive activity. On the other hand, antioxidative activity was detected in all fermented milks, especially in those fermented with lactobacilli. Analysis by mass spectrometry wasn't conclusive in order to identify the peptides responsible for such biological activity.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. O leite.....	1
1.1.1. Composição do leite	1
1.1.1.1. Hidratos de carbono	2
1.1.1.2. Lípidos.....	2
1.1.1.3. Vitaminas e sais minerais.....	3
1.1.1.4. Proteínas	4
1.1.2. Valor nutricional e económico dos diferentes leites.....	14
1.1.3. Leite Fermentado	17
1.2. As bactérias lácticas (LAB)	18
1.2.1. Metabolismo dos hidratos de carbono	19
1.2.2. Sistema proteolítico	20
1.2.3. Simbióticos	24
1.2.3.1. Probióticos e Prebióticos.....	25
1.2.3.2. Leites fermentados como veículo de probióticos.....	27
1.3. Péptidos bioactivos	29
1.3.1. Identificação de péptidos bioactivos em leites fermentados	31
1.3.1.1. Obtenção dos leites fermentados.....	31
1.3.1.2. Avaliação da extensão da proteólise	32
1.3.1.3. Determinação da actividade biológica	34
1.3.1.3.1 Actividade anti-hipertensiva	34
1.3.1.3.2 Actividade antioxidante.....	37
1.3.1.4. Separação e identificação dos péptidos.....	39
1.3.2. Péptidos bioactivos identificados	41
2. Objectivos do trabalho	44
3. Materiais e Métodos	46
3.1. Produção de leites fermentados	46
3.2. Análise dos leites fermentados	48
3.3. Preparação da fracção solúvel.....	50

3.4.	Determinação da extensão da proteólise.....	51
3.5.	Avaliação das actividades biológicas dos leites fermentados.....	53
3.6.	Análise por espectrometria de massa.....	57
3.7.	Tratamento estatístico.....	59
4.	Apresentação e discussão de resultados.....	60
4.1.	Caracterização dos leites fermentados.....	60
4.2.	Extensão da proteólise.....	65
4.3.	Determinação da actividade anti-hipertensiva.....	70
4.4.	Determinação da actividade antioxidante.....	71
4.5.	Análise por espectrometria de massa.....	78
5.	Conclusões.....	86
6.	Referências.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosose, forma β da lactose, em projecção de Haworth. Adaptado de Nelson & Cox [6].	2
Figura 2 – Grelha com o alinhamento das α_{s1} -caseínas provenientes de leites de cabra (B, P18626), ovelha (A, P04653) e vaca (B, P02662). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.	11
Figura 3 – Grelha com o alinhamento das α_{s2} -caseínas provenientes de leites de cabra (P33049), ovelha (P04654) e vaca (B, P02663). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.	11
Figura 4 – Grelha com o alinhamento das β -caseínas provenientes de leites de cabra (P33048), ovelha (P11839) e vaca (A ² , P02666). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.	11
Figura 5 – Grelha com o alinhamento das κ -caseínas provenientes de leites de cabra (P02670), ovelha (P02669) e vaca (A, P02668). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.	12
Figura 6 – Grelha com o alinhamento das α -lactalbuminas provenientes de leites de cabra (P00712), ovelha (P09462) e vaca (P00711). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.	12
Figura 7 – Grelha com o alinhamento das β -lactoglobulinas provenientes de leites de cabra (P02756), ovelha (B, P67976) e vaca (B, P02754). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.	12
Figura 8 – Esquema da libertação de péptidos bioactivos e possíveis diferenças entre a fragmentação da proteína através de fermentação e/ou digestão gastrointestinal. Adaptado de Moller et al [53].	30
Figura 9 – Fluxograma do trabalho experimental realizado nesta tese.	46
Figura 10 – Representação esquemática do procedimento experimental da produção dos leites fermentados. Cada 1 dos 5 lotes de leite inoculado representados no esquema foi preparado em duplicado. Os inóculos designados na figura por La5, LCS-01, L26 e BB12 correspondem respectivamente às estirpes <i>L. acidophilus</i> La-5, <i>L. casei</i> -01, <i>L. paracasei</i> LAFTI [®] L26 e <i>B. animalis</i> Bb-12.	48
Figura 11 – Representação gráfica da evolução do pH e do número de microrganismos viáveis, com desvios-padrão das réplicas biológicas, nos 3 tipos de leites: quadrados verdes – leite de vaca; triângulos cor-de-laranja – leite de cabra; bolas azuis – leite de ovelha. Símbolos a cheio para os resultados de pH e símbolos sem preenchimento para os resultados das contagens. A. - Controlo (leite fermentado sem estirpe); B. - Leite fermentado com <i>Lactobacillus casei</i> -01; C. - Leite fermentado com <i>Lactobacillus paracasei</i> LAFTI [®] L26; D. - Leite fermentado com <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12.	61
Figura 12 – Evolução das fracções de azoto solúvel (WSN) e azoto não-proteico (NPN) para os leites fermentados de vaca (A.), leites fermentados de cabra (B.) e leites fermentados de ovelha (C.), controlo e inoculados com <i>Lactobacillus casei</i> -01 (LCS-01), <i>L. paracasei</i> LAFTI [®] L26 (L26) e <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12 (BB12), aos 0 d (■), 14 d (■), e 21 d (■) de armazenamento.	66
Figura 13 – Evolução dos resultados obtidos para a determinação da actividade antioxidante por ABTS, expressos em equivalentes de ácido ascórbico (μ g de ácido ascórbico/g de proteína), nos leites fermentados de vaca (A.), de cabra (B.) e de ovelha (C.) controlo e inoculados com <i>Lactobacillus casei</i> -01, <i>L. paracasei</i> LAFTI [®] L26 e <i>Bifidobacterium</i>	

<i>animalis</i> Bb-12, aos 0 d (■), 14 d (■, apenas no leite de vaca fermentado com LCS-01), e 21 d (■) de armazenamento.....	72
Figura 14 – Cromatograma de HPLC obtido para a fracção com PM < 3kDa do leite de vaca fermentado com <i>L. paracasei</i> LAFTI® L26 com sobreposição dos espectros obtidos para as duas injeções desta amostra. A escala vertical representa a intensidade do pico, expressa em mAU, com valor mínimo -100 e máximo 1000. A escala horizontal representa o tempo de retenção, expresso em minutos, com valor mínimo 0 e máximo 80.....	79
Figura 15 – Cromatogramas obtidos por HPLC ao tempo de retenção 5 a 15min obtidos para as fracção com PM < 3kDa das combinações origem do leite/estirpe apresentadas abaixo de cada perfil, apresentados com sobreposição dos espectros obtidos para as duas injeções desta amostra. A escala vertical representa a intensidade do pico, expressa em mAU, com valor mínimo -100 e máximo 1000. A escala horizontal representa o tempo de retenção, expresso em minutos, com valor mínimo 5 e máximo 15 para cada perfil.	81
Figura 16 – Exemplo da metodologia utilizada para identificação de péptidos nas diferentes amostras. Neste exemplo mostra-se a identificação do péptido com m/z 679,6. Em A. mostra-se o cromatograma HPLC-MS do ião com m/z 679,6. Na figura B. apresenta-se uma ampliação do espectro de massa (m/z 678-700) adquirido no intervalo de tempo 23-25 minutos.....	82
Figura 17 – Representação gráfica da distribuição dos picos identificados pela análise por MS em função da razão m/z. Cada barra representa um intervalo de m/z como se indica na legenda abaixo do gráfico. As classes identificadas devem ser interpretadas como as fracções com PM < 3kDa com origem nos leite fermentado na combinação apresentada no modelo “inicial da origem do leite_ estirpe”. Na designação da estirpe utiliza-se a nomenclatura L26 para <i>L. paracasei</i> LAFTI® L26, LCS-01 para <i>L. casei-01</i> e BB12 para <i>B. animalis</i> Bb-12.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média dos nutrientes básicos nos leites de cabra, ovelha e vaca (em %). Adaptado de Park et al [2].	1
Tabela 2 – Composição em ácidos gordos dos leites de cabra, vaca e ovelha (em % por massa de lípidos). Adaptado de Jandal [8].	3
Tabela 3 – Composição em minerais dos leites de cabra, ovelha e vaca. Adaptado de Raynal-Ljutovac et al [7].	4
Tabela 4 – Características das principais proteínas presentes no leite de vaca ao nível dos resíduos de aminoácidos e variantes genéticas. Adaptado de Park et al e Hui [1-2]. (a.a. – número de aminoácidos)	6
Tabela 5 – Actividades biológicas das proteínas presentes no leite de vaca. Adaptado de Yalçin e Korhonen et al [13, 20].	10
Tabela 6 – Resumo das peptidases encontradas em LAB. Adaptado de Christensen. et al, Kunji et al e Liu et al [42-43, 47].	23
Tabela 7 – Resumo dos benefícios na saúde do hospedeiro exercidos pelas bactérias probióticas a usar neste estudo	26
Tabela 8 – Resumo dos péptidos documentados para leites fermentados.	43
Tabela 9 – Quantidades de reagentes por poço em cada microplaca preparada para a determinação da actividade anti-hipertensiva das amostras.	55
Tabela 10 – Valores médios obtidos para as medições de pH e contagens de número de células viáveis, apresentado como o logaritmo de base 10 do número de CFU's por grama de leite inoculado, nos leites inoculados antes da fermentação. Nota: controlo é previamente acidificado com ácido láctico.	60
Tabela 11 – Número de picos identificados nos espectros de MS de cada fracção. Os números de picos comuns e únicos, são os picos comuns e únicos entre os espectros dos leites da mesma origem.	82
Tabela 12 – Distribuição dos picos comuns encontrados na análise por MS nas fracções com PM < 3kDa dos leites de ovelha fermentados com 0 dias de armazenamento.	83

ABREVIATURAS

AAPH	dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANCOSE	Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela
CCP	Fosfato de cálcio coloidal, do inglês <i>colloidal calcium phosphate</i>
CFU	Unidades formadoras de colónias, do inglês <i>colony forming units</i>
CN	Caseína
DDR	Dose diária recomendada
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECA	Enzima conversora da angiotensina I
ET	Transferência de electrão, do inglês <i>electron transfer</i>
HAT	Transferência de átomo de hidrogénio, do inglês <i>hydrogen atom transfer</i>
HHL	hipuril-L-histidil-L-leucina
HPLC - MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa <i>tandem</i>
Ig	Imunoglobulina
LA	α -Lactalbumina
LAB	Bactérias lácticas, do inglês <i>lactic acid bacteria</i>
LF	Lactoferrina
LG	β -Lactoglobulina
MCFA	Ácidos gordos de cadeia média, do inglês <i>medium chain fatty acids</i>
MS	Espectrometria de massa, do inglês <i>mass spectrometry</i>
NPN	Azoto não-proteico, do inglês <i>nonprotein nitrogen</i>
OPA	<i>o</i> -ftaldialdeído
ORAC	Capacidade de absorvância dos radicais de oxigénio, do inglês <i>oxygen radical absorbance capacity</i>
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>

- PTM's** Modificações pós-traducionais, do inglês *post-translational modifications*
- RP-HPLC** Cromatografia líquida de alta *performance* com uma coluna de fase reversa
- SA** Albumina sérica, do inglês *serum albumin*
- SCFA** Ácidos gordos de cadeia curta, do inglês *short chain fatty acid*
- SDS** Dodecil-sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*
- TCA** Ácido tricloroacético, do inglês *trichloroacetic acid*
- TEAC** Capacidade antioxidante equivalente à do Trolox[®], do inglês *Trolox[®] equivalent antioxidant capacity*
- TFA** Ácido Trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*
- TN** Azoto total, do inglês *total nitrogen*
- Tricina-SDS-PAGE** Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio e tricina
- UDP** Uridina difosfato
- WSN** Azoto solúvel, do inglês *water soluble nitrogen*

1. INTRODUÇÃO

Neste estudo pretende-se estudar as actividades anti-hipertensiva e antioxidante dos péptidos formados em leites de cabra, ovelha e vaca fermentados com bactérias probióticas das estirpes *Bifidobacterium animalis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus casei-01* e *Lactobacillus paracasei* LAFTI® L26.

1.1. O LEITE

O leite é um fluido produzido nas glândulas mamárias e secretado pelos mamíferos fêmeas. Este fluido é utilizado como alimento pelos recém-nascidos e serve o propósito de responder a todas as necessidades nutricionais, e algumas necessidades fisiológicas destes. Devido ao facto das necessidades dos recém-nascidos variarem de espécie para espécie e ao longo do tempo, a composição do leite apresenta grandes variações entre espécies e também durante o período da lactação. Outros factores como o stress fisiológico, a mastite, a dieta, o modo de criação e as condições ambientais também influenciam a composição do leite [1-2].

1.1.1. *Composição do leite*

Independentemente da origem do leite, a água é o seu componente mais abundante [3-4]. Nela encontram-se dissolvidos minerais, vitaminas, lactose e a fracção solúvel das proteínas. Nesta fracção solúvel ocorrem ainda colóides de proteínas insolúveis e lípidos em emulsão[3]. Esta mistura de nutrientes apresenta normalmente um pH compreendido entre 6,5 e 6,7 [5].

Tabela 1 - Composição média dos nutrientes básicos nos leites de cabra, ovelha e vaca (em %). Adaptado de Park et al [2].

Leite	Lípidos	Proteínas			Lactose	Minerais
		total	caseínas	proteínas do soro		
Cabra	3,8	3,4	2,4	0,6	4,1	0,8
Ovelha	7,9	6,2	4,2	1,0	4,9	0,9
Vaca	3,6	3,2	2,6	0,6	4,7	0,7

Na Tabela 1 está discriminada a composição nutricional média dos leites das três espécies em estudo. Pela análise desta é possível afirmar que, de entre os três leites em estudo, o leite de ovelha é o mais rico ao nível dos macro- e micronutrientes referidos.

Em consequência disso, este é o leite com maior valor energético e maior teor de sólidos totais [2].

1.1.1.1. Hidratos de carbono

A lactose (Figura 1) é um dissacarídeo de resíduos de galactose e glucose ligados entre si através duma ligação glicosídica β -1,4. Este dissacarídeo é o principal hidrato de carbono presente no leite sendo essencial na produção dos produtos lácteos fermentados. Nos leites em estudo o seu teor apresenta variações entre os 4,1% no leite de cabra e 4,9% no leite de ovelha, passando pelos 4,7% presentes no leite de vaca (Tabela 1) [2]. Contudo, as quantidades de lactose no leite podem variar entre 0 e 10%[1].

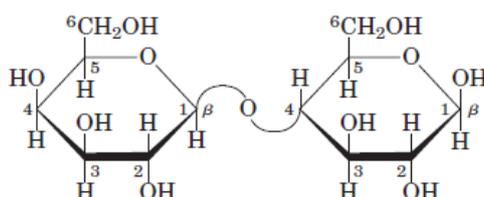


Figura 1 – β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosose, forma β da lactose, em projecção de Haworth. Adaptado de Nelson & Cox [6].

O valor nutricional da lactose está relacionado, não só com a utilização deste hidrato de carbono como fonte de energia pelo organismo, mas também com as propriedades estruturais da galactose. Este resíduo e alguns derivados, como por exemplo as galactosaminas, são constituintes de vários glicofosfolípidos e glicoproteínas, que são moléculas importantes nas membranas celulares [3].

1.1.1.2. Lípidos

Os lípidos são o macronutriente que apresenta maior variabilidade entre os leites, não só ao nível da quantidade (entre 1 e 50%) mas também ao nível da qualidade. São também o nutriente mais importante do ponto de vista nutricional e uma importante fonte de ácidos gordos essenciais, como por exemplo o ácido linoleico (C18:2) [1-2, 7]. Este nutriente encontra-se no leite em emulsão sob a forma de glóbulos de lípidos cuja abundância e tamanho variam consoante a origem do leite, sendo mais abundantes e de menores dimensões nos leites de cabra e ovelha, comparativamente ao leite de vaca [2, 7].

Nos leites em estudos a percentagem de lípidos varia entre os 3,6 e 3,8 % nos leites de vaca e cabra, respectivamente, e 7,9% no leite de ovelha (Tabela 1), sendo que dentro destes teores variáveis existem ainda diferenças na composição em ácidos gordos [2, 7-8]. Se analisarmos o perfil de ácidos gordos para cada leite (Tabela 2), podemos afirmar que os leites dos pequenos ruminantes (cabra e ovelha) são mais ricos em ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) e média (MCFA) que o leite proveniente de vacas [7-8]. O elevado teor destes ácidos gordos de cadeia menor é a principal característica dos lípidos dos leites dos pequenos ruminantes, com especial destaque no leite de cabra. Esta é uma característica importante no que diz respeito ao valor nutricional, uma vez que, os MCFA se destacam pelo seu metabolismo de absorção rápida, sendo deste modo uma forma rápida de obtenção de energia.

Tabela 2 – Composição em ácidos gordos dos leites de cabra, vaca e ovelha (em % por massa de lípidos). Adaptado de Jandal [8].

Ácido Gordo	Origem do leite		
	Cabra	Vaca	Ovelha
C4:0	2,6	3,3	4,0
C6:0	2,9	1,6	2,6
C8:0	2,7	1,3	2,5
C10:0	8,4	3,0	7,5
C12:0	3,3	3,1	3,7
C14:0	10,3	3,5	11,9
C16:0	24,6	26,5	25,2
C16:1	2,2	2,3	2,2
C18:0	12,5	14,6	12,6
C18:1	28,5	29,8	20,0
C18:2	2,2	2,5	2,1

1.1.1.3. Vitaminas e sais minerais

O leite contém praticamente todas as vitaminas necessárias e em quantidades necessárias para o normal crescimento dos recém-nascidos, contudo os leites de diferentes origens têm variações ao nível das vitaminas mais abundantes [1, 3]. O leite de vaca constitui uma boa fonte de vitaminas do grupo B: biotina (vitamina B₇), cobalamina (vitamina B₁₂) e riboflavina (vitamina B₂) [1]. Por sua vez, os leites de ovelha e cabra são também ricos em riboflavina (vitamina B₂) e em tiamina (vitamina B₁), ácido pantotênico (vitamina B₅) e retinol (vitamina A), carecendo na sua

composição de ácido ascórbico (vitamina C), calciferol (vitamina D), cobalamina (vitamina B₁₂) e ácido fólico (vitamina B₉) [8].

Os principais minerais presentes no leite são o cálcio, o fósforo, o potássio, o magnésio, o cloreto e o sódio. Contudo, o leite é um alimento pouco rico em ferro [2-4, 7]. O teor destes e dos outros sais minerais no leite varia consoante a sua origem (Tabela 3). Ao nível da matriz do leite, estes minerais desempenham mais do que uma função nutricional, sendo de extrema importância na estabilização da fracção insolúvel das proteínas e responsáveis pelo aspecto opaco e esbranquiçado do leite [1-3].

Tabela 3 – Composição em minerais dos leites de cabra, ovelha e vaca. Adaptado de Raynal-Ljutovac et al [7].

Mineral	Origem do leite		
	Cabra ^a	Ovelha ^b	Vaca ^a
Cálcio (mg)	1260	1950-2000	1200
Fósforo (mg)	970	1240-1580	920
Potássio (mg)	1900	1360-1400	1500
Sódio (mg)	380	440-580	450
Cloreto (mg)	1600	110-1120	1100
Magnésio (mg)	130	180-210	110
Ferro (µg)	550	720-1222	460

^a-por L; ^b-por kg

1.1.1.4. Proteínas

A existência de produtos lácteos fermentados, bem como muitas das suas propriedades, depende particularmente das proteínas presentes no leite. É por modificações nestas proteínas, por proteólise bacteriana e precipitação isoelétrica, que são obtidos muitos produtos lácteos, de entre os quais os leites fermentados [5]. Não obstante à importância das proteínas, os restantes nutrientes presentes no leite também têm uma enorme influência ao nível das modificações sofridas pelo leite durante a fermentação, sobretudo a lactose pelo seu papel ao nível do metabolismo das bactérias lácticas [3, 9-11].

No leite as proteínas podem ser divididas em duas fracções, a fracção insolúvel e a fracção solúvel. A fracção insolúvel é composta por caseínas que se distribuem como colóides sob a forma de micelas em suspensão, enquanto a fracção solúvel é composta pelas proteínas do soro [2]. No global as proteínas podem representar entre 1 a 20% do leite e a razão caseínas/proteínas do soro pode ir desde os 40/60 até aos 80/20 [12]. No

caso particular dos leites em estudo, os teores de proteína são menores nos leites de vaca e cabra, respectivamente 3,2% e 3,4%, e apresentam um valor superior, de 6,2%, no leite de ovelha (Tabela 1). A razão caseínas/proteínas do soro é semelhante nos 3 leites e é aproximadamente 80/20 [2].

A fracção das caseínas é uma fracção heterogénea que é composta por 4 tipos de caseínas: caseína α_{s1} (α_{s1} -CN), caseína α_{s2} (α_{s2} -CN), caseína β (β -CN) e caseína κ (κ -CN). Duma forma geral, as caseínas são fosfoproteínas que contém grupos fosfato esterificados nos resíduos de serina, os quais têm um papel muito importante na estrutura micelar da caseína, são pobres em enxofre e este, na sua maioria, está presente sob a forma de resíduos de metionina, sendo poucos ou mesmo inexistentes os resíduos de cisteína e cistina [3, 6, 13].

As caseínas α_{s1} , α_{s2} e β , que representam cerca de 85% das caseínas presentes no leite, são sensíveis às concentrações de cálcio e precipitam quando sujeitas a concentrações iguais ou superiores a 240mg/L deste mineral. Uma vez que, em média, o leite apresenta concentrações superiores, de 1200mg/L para o caso do leite de vaca que é, dos três em estudo, o mais pobre em cálcio (Tabela 3), era de esperar que as caseínas surgissem precipitadas na matriz do leite. Contudo não é isso que se observa, a α_{s1} -CN, α_{s2} -CN e β -CN surgem no leite sob a forma de micelas de caseína que só se formam devido às propriedades da κ -CN. Esta caseína destaca-se por ser solúvel em concentrações elevadas de cálcio e reagem com as caseínas sensíveis ao cálcio, estabilizando-as através da formação da estrutura micelar [1].

As micelas de caseína são partículas coloidais esféricas com um diâmetro que pode variar entre 50 a 600nm e é em média de 180nm, 193nm e 260nm nos leites de vaca, ovelha e cabra, respectivamente [1-2]. A microestrutura desta micelas não se encontra completamente definida, sendo o modelo das submicelas aquele que é melhor aceite. Este modelo propõe uma estrutura micelar composta por submicelas ligadas entre si por fosfato de cálcio coloidal (CCP) e revestidas por uma camada com cerca de 7nm de espessura rica em κ -CN e com algumas outras caseínas na sua composição. Embora este modelo não reúna consenso e outros modelos existam para explicar a microestrutura das micelas de caseína, a função do CCP e o revestimento rico em κ -CN descritos no modelo das submicelas surgem também na base dos outros modelos propostos.

Já foi referido que as micelas de caseínas estão interligadas por fosfato de cálcio. Nestas existem ainda pequenas quantidades de outros minerais (sódio, potássio, magnésio), sendo a mineralização e organização destas estruturas variável entre leites de diferentes origens. Nos três leites em estudo, as micelas de caseína são maiores, mais mineralizadas e menos hidratadas nos leites dos pequenos ruminantes que são muito semelhantes entre si no que respeita às características das micelas de caseínas [2-3]. As caseínas do leite de cabra, quando comparadas com as do leite de vaca, contêm mais cálcio e fósforo inorgânico, são menos hidratadas, menos estáveis ao calor e libertam β -CN mais facilmente [2].

Ainda no que diz respeito às caseínas, a sequência primária de aminoácidos destas proteínas é muito ricas em resíduos de prolina, o que tem como consequência a existência de poucas estruturas secundárias como α -hélices e folhas- β (Tabela 4). Esta menor proporção de estruturas secundárias típicas faz com que as caseínas sejam proteínas bastantes susceptíveis a hidrólise sem desnaturação prévia. As caseínas apresentam ainda grande estabilidade quando sujeitas a elevadas temperaturas e têm a particularidade de serem pouco solúveis e precipitarem a pH 4,5, o seu ponto isoeléctrico [1, 3, 13].

Tabela 4 – Características das principais proteínas presentes no leite de vaca ao nível dos resíduos de aminoácidos e variantes genéticas. Adaptado de Park et al e Hui [1-2]. (a.a. – número de aminoácidos)

Proteína	a.a. da cadeia maturada			a.a. de sinalização	Grupos fosfato	Variantes genéticas
	total	Pro	Cys			
α_{s1} -caseína	199	17	0	15	8	A, B, C, D, E, F, G, H
α_{s2} -caseína	207	10	2	15	10-13	A, B, C, D
β -caseína	209	35	0	15	5	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E, F, G
κ -caseína	169	20	2	21	1	A, B, C, D, E, F ^S , F ^L , G ^S , H, I, J
β -lactoglobulina	162	8	5	16	0	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
α -lactalbumina	123	2	8	19	0	A, B, C

No que diz respeito aos três leites comparados, as caseínas presentes apresentam pequenas variações entre as diferentes origens. E até mesmo entre as espécies da mesma sub-família é possível encontrar variabilidade associada a polimorfismos genéticos e modificações pós-traducionais (PTM's) [2, 7-8]. Estas diferenças são importantes do

ponto de vista de comparação dos três tipos de leites e da diversidade dentro dos leites da mesma origem pois produzem alterações que podem afectar de forma significativa o comportamento dos leites do ponto de vista tecnológico.

Os polimorfismos genéticos são responsáveis por teores variáveis de cada caseína nos leites com origem em animais da mesma sub-família e também por diferença ao nível das suas sequências primárias [2, 8]. Esta última pode ter influência ao nível das propriedades físico-químicas das proteínas, quer por alteração do número e local para ocorrência de PTM's, quer por modificações ao nível do arranjo tridimensional da proteína. Embora os diferentes polimorfismos não estejam inteiramente caracterizados para os 3 leites em estudo, é possível encontrar documentado alguns dos polimorfismos já identificados, uns a partir de evidências ao nível genético, outros ao nível do estudo da composição dos leites.

Ao nível das caseínas do leite de cabra os principais polimorfismos genéticos identificados para as caseínas α_{s1} e α_{s2} estão relacionados com os teores destas proteínas nos diferentes leites de cabra [2]. Relativamente aos teores de α_{s1} -CN foram identificados: 8 alelos (A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, H e L) responsáveis por conteúdos superiores (3,5g/L) desta caseína no leite; 2 alelos (E e I) que produzem níveis médios (1,1 – 1,7g/L); 2 alelos (F e G) responsáveis pelos baixos teores de caseína (0,45g/L); e 2 alelos (O₁ e O₂) que geram leites de cabra sem α_{s1} -CN. No que diz respeito ao conteúdo de α_{s2} -CN nos leites de cabra, os alelos identificados estão também relacionados com os níveis de expressão desta caseína tendo sido identificados: 5 alelos (A, B, C, E e F) relacionados com a presença de níveis de α_{s2} -CN considerados normais (2,5g/L); 1 alelo (D) que é responsável por teores diminuídos; e 1 alelo (O) que produz leites sem esta proteína. Para a proteína β -CN também foram identificados vários alelos que são responsáveis por diferentes níveis de expressão desta caseína no leite de cabra, bem como alelos responsáveis pelo número de fosforilações (4, 5 ou 6 fosforilações) na proteína. Também a κ -CN apresenta polimorfismos genéticos com diversos alelos já identificados. Devido à combinação entre os diferentes polimorfismos genéticos e as espécies de cabra utilizadas para produção de leite, frequentemente o leite de cabra é associados à presença de pouca ou nenhuma α_{s1} -CN [14].

Também nos leites de ovelha existem 5 alelos (A, B, C, D e E) identificados no que diz respeito à expressão da α_{s1} -CN. As variantes produzidas pelos alelos A e C

diferem entre si no aminoácido da posição 13, que é uma serina na variante A e uma prolina na variante C, implicando isto a perda de um local de fosforilação e o aumento das restrições conformacionais da variante C [2, 12, 15]. Contudo, do ponto de vista do grau de fosforilação, a variante D desta caseína é a variante menos fosforilada por determinação genética. No que diz respeito à α_{s2} -CN são duas as variantes genéticas identificadas (A e B), as quais diferem na substituição da Asn₄₉ e da Lys₂₀₀ presentes na variante A por um Asp₄₉ e uma Asn₂₀₀. Entre os leites de ovelha existem documentadas duas variantes polimórficas não genéticas para a β -CN, β_1 e β_2 , as quais diferem no grau de fosforilação sendo que a primeira tem 6 grupos fosfatos, mais um que a segunda. Para esta caseína, estão ainda documentados três variantes polimórficas genéticas (A, B e C), cuja variante A têm um resíduo de glutamato na posição 2 enquanto na variante C surge um resíduo de glutamina nesta posição. Relativamente à κ -CN dos leites de ovelha, apenas foram encontrados polimorfismos não genéticos que se manifestam pelos diferentes níveis de glicolização dos três resíduos de treonina nas posições 135, 137 e 138 e fosforilação dos locais de fosforilação nas serinas das posições 151 e 168 [2].

Nos leites de vaca, também são várias as variantes genéticas documentadas [1]. São 8 as variantes genéticas documentadas para a α_{s1} -CN, 4 para a α_{s2} -CN, 9 para a β -CN e 11 no caso da κ -CN (Tabela 4).

A fracção das proteínas do soro é constituída por α -Lactalbumina (α -LA), β -Lactoglobulina (β -LG) e proteínas menos abundantes como as imunoglobulinas (Ig's), albumina sérica (SA), lactoferrina (LF) e algumas enzimas como a lactoperoxidase e a lisozima [2-3, 13]. A β -LG é a principal proteína do soro nos leites em estudo, contudo esta proteína não está presente em leites de algumas origens, como é o caso do leite humano no qual a principal proteína do soro é a α -LA. Esta última, α -LA, está também presente nos leites dos três ruminantes em estudo e apresenta uma grande homologia entre estes. O teor de β -LG no leite de cabra é inferior comparativamente aos leites de ovelha e vaca [2-3].

O perfil de aminoácidos nestas proteínas do soro é de elevado interesse, uma vez que contém bastantes aminoácidos essenciais. Estas proteínas são também ricas em resíduos com enxofre (Tabela 4), os quais, na β -LG, desempenham um papel importante

na produção de produtos lácteos através da sua desnaturação térmica seguida da formação de pontes dissulfureto com o resíduo de enxofre presente na κ -CN [3, 7].

À semelhança do que acontece nas caseínas, também as proteínas do soro apresentam polimorfismos entre as raças duma mesma sub-família [2]. É possível observar na Tabela 4 que nos leites de vaca a β -LG apresenta 10 variantes polimórficas enquanto no caso da α -LA são 3 as variantes genéticas [1].

Relativamente aos polimorfismos nas proteínas do soro de leites de ovelha, são 3 as variantes polimórficas (A, B e C) da β -LG identificadas. Estas variantes diferem umas das outras nos resíduos de aminoácidos das posições 20 e 148 que são respectivamente uma tirosina e uma arginina na variante A, enquanto na variante B a posição 20 é substituída por uma histidina e na variante C as posições 20 e 148 contém resíduos de histidina e glutamina, respectivamente [2, 16].

No que diz respeito aos leites de cabra e às variantes genéticas das suas proteínas do soro, estão relatadas 2 variantes de β -LG e 3 de α -LA. No caso dos polimorfismos na α -LA uma das variantes é o resultado da existência de um alelo nulo o que resulta na não expressão desta proteína no leite [2].

As proteínas presentes no leite são consideradas proteínas de qualidade pois são bastante equilibradas no teor de aminoácidos e constituem uma excelente fonte de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento de tecidos, como o músculo que contém uma elevada quantidade de proteína na sua estrutura contráctil. As proteínas são ainda um nutriente importante em termos de função fisiológica do leite, pois as proteínas nele contidas são biologicamente activas desempenhando funções antimicrobianas, anticancerígenas, ao nível da protecção imunitária, como transportadores de minerais e moléculas, entre outras. As funções biológicas das proteínas do leite encontram-se sintetizadas na Tabela 5. [3-4, 13, 17-19].

Recorrendo à base de dados da UniProt e à ferramenta disponibilizada que permite o alinhamento de sequências primárias de proteínas, para cada uma das proteínas mais abundantes do leite, construiu-se uma grelha com o alinhamento das 6 proteínas mais abundantes nos três leites. Estas grelhas apresentam-se abaixo nas Figuras 2 a 7, com indicação da variante genética, quando identificada, e do *accession*

number (número de acesso) em cada legenda e entre parênteses no modelo “(‘variante genética’, ‘*accession number*’)”.

Tabela 5 – Atividades biológicas das proteínas presentes no leite de vaca. Adaptado de Yalçın e Korhonen et al [13, 20].

Proteína	Peso Molecular	Atividade Biológica
Caseínas	14 a 22kDa	Transporte de iões (Ca,PO ₄ ,Fe,Zn,Cu) Imunomodulação
β-Lactoglobulina	18,4kDa	Transporte de retinol e ácidos gordos Antioxidante
α-Lactalbumina	14,2kDa	Regulação da síntese de lactose Transporte de cálcio Imunomodulação Anticancerígena
Imunoglobulinas	150 a 1000kDa	Protecção imunitária
Lactoferrina	80kDa	Antimicrobiana Antiviral Antioxidante Anticancerígena Antitóxica Anti-inflamatória Antitrombótica Imunomodulação Regulação do crescimento celular Absorção de ferro
Lactoperoxidase	78kDa	Antimicrobiana Efeito sinérgico com lactoferrina e imunoglobulinas
Lisozima	14kDa	Antimicrobiana Efeito sinérgico com lactoferrina e imunoglobulinas

Comparando os dados apresentados nas Figuras 2 a 7 pode afirmar-se que as proteínas mais abundantes no leite apresentam pequenas variações na estrutura primária, dependendo da origem do leite, sendo as κ-caseínas aquelas que apresentam um maior número de aminoácidos diferentes. E, apesar do processo de hidrólise das proteínas não ser apenas influenciado pela estrutura primária das proteínas, a elevada homologia entre as três origens é um bom indicador da possibilidade de se obterem os mesmos péptidos para os três tipos de leite.


```

MMKSFLLVVTILALTLFPLGAQEQNQEQPICCEKDERFFDDKIAKYIPIQYVLSRYPSYG 60 CASK_CAPHI
MMKSFLLVVTILALTLFPLGAQEQNQEQRICCEKDERFFDDKIAKYIPIQYVLSRYPSYG 60 CASK_SHEEP
MMKSFLLVVTILALTLFPLGAQEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPSYG 60 CASK_BOVIN
*****
LNYYQQRPEVALINNFQFLPYPPYAKPVAVRSPAQTILQWQVLPNTVPAKSCQDQPTTLARHP 120 CASK_CAPHI
LNYYQQRPEVALINNFQFLPYPPYAKPVAVRSPAQTILQWQVLPNAVPAKSCQDQPTAMARHP 120 CASK_SHEEP
LNYYQQRPEVALINNFQFLPYPPYAKPAAVRSPAQTILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTAMARHP 120 CASK_BOVIN
*****
HPHLSFMAIPPKKQDKTEVPAINTIASAEPTVHSTPTTEAIVNTVDNPEASSESIASAS 180 CASK_CAPHI
HPHLSFMAIPPKKQDKTEIPAINTIASAEPTVHSTPTTEAVVNAVNDNPEASSESIASAP 180 CASK_SHEEP
HPHLSFMAIPPKKQDKTEIPTINTIASGEPT--STPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPP 178 CASK_BOVIN
*****
ETNTAQVTSTEV 192 CASK_CAPHI
ETNTAQVTSTEV 192 CASK_SHEEP
EINTVQVTSTAV 190 CASK_BOVIN
* * * . * * * * *

```

Figura 5 – Grelha com o alinhamento das κ -caseínas provenientes de leites de cabra (P02670), ovelha (P02669) e vaca (A, P02668). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.

```

MMSFVSLLLVGLFHFATQAEQLTKCEVFQKLDKLDYGGVSLPEWVCTAFHTSGYDTQAI 60 LALBA_CAPHI
MMSFVSLLLVGLFHFATQAEQLTKCEVFQELKLDKLDYGGVSLPEWVCTAFHTSGYDTQAI 60 LALBA_SHEEP
MMSFVSLLLVGLFHFATQAEQLTKCEVFRLEKLDKLDYGGVSLPEWVCTTFFHTSGYDTQAI 60 LALBA_BOVIN
*****
VQNNNSTEYGLFQINNKIWCKDDQNPHSRNICNISCDKFLDDDLTDDIVCAKKILDKVGVI 120 LALBA_CAPHI
VQNNNSTEYGLFQINNKIWCKDDQNPHSRNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKILDKVGVI 120 LALBA_SHEEP
VQNNNSTEYGLFQINNKIWCKDDQNPHSRNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKILDKVGVI 120 LALBA_BOVIN
*****
NYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL 142 LALBA_CAPHI
NYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL 142 LALBA_SHEEP
NYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL 142 LALBA_BOVIN
*****

```

Figura 6 – Grelha com o alinhamento das α -lactalbuminas provenientes de leites de cabra (P00712), ovelha (P09462) e vaca (P00711). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.

```

MKCLLLALGLALACGIQAIIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY 60 LACB_CAPHI
MKCLLLALGLALACGVQAIIVTQTMKGLDIQKVAGTWHSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY 60 LACB_SHEEP
MKCLLLAL--ALTCGAQALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY 58 LACB_BOVIN
*****
VEELKPTPEGNLEILLQKWENGECQAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKY 120 LACB_CAPHI
VEELKPTPEGNLEILLQKWENGECQAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKY 120 LACB_SHEEP
VEELKPTPEGDLEILLQKWENGECQAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKY 118 LACB_BOVIN
*****
LLFCMENSAAEPEQSLACQCLVVRTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIRLAFNPTQLEGQCHV 180 LACB_CAPHI
LLFCMENSAAEPEQSLACQCLVVRTPEVDNEALEKFDKALKALPMHIRLAFNPTQLEGQCHV 180 LACB_SHEEP
LLFCMENSAAEPEQSLACQCLVVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI 178 LACB_BOVIN
*****

```

Figura 7 – Grelha com o alinhamento das β -lactoglobulinas provenientes de leites de cabra (P02756), ovelha (B, P67976) e vaca (B, P02754). Informação obtida e compilada através da base de dados da UniProt.

Contudo, apesar da elevada homologia, as pequenas variações podem revelar-se mais significativas do que aparentam e acrescentar, deste modo, alguma diversidade nos produtos finais da proteólise. Se analisarmos a Figura 4, nas posições 74 a 76 após os 15 primeiros resíduos de sinalização, é possível encontrar a sequência IPP na β -caseína do leite de vaca, a qual corresponde a um dos péptidos com actividade anti-hipertensiva

melhor documentado, como será abordado adiante. Comparando estas posições para os leites dos pequenos ruminantes, observa-se que a sequência é ILP e que provavelmente da formação deste péptido resultará uma molécula com propriedades diferentes das do tripéptido já identificado.

Em suma, a fracção proteica do leite é constituída pelas proteínas mais abundantes, as quais foram alinhadas para os três leites em estudo, proteínas menos abundantes, revistas acima e com um papel importante na bioactividade endógena do leite, e proteínas com funções catalíticas, as enzimas, que ainda não foram abordadas [3, 21].

São muitas as enzimas endógenas do leite, entre 50 a 60. Os níveis destas enzimas variam bastante dependendo da raça, estado de saúde, dieta, estágio da lactação e idade do animal, contudo apenas algumas destas enzimas têm impacto na qualidade do leite [3, 21]. As principais enzimas responsáveis por deterioração do leite são lipases, proteinases, a fosfatase ácida e a xantina oxidase. Como no presente trabalho se pretende estudar a formação de péptidos, de entre as enzimas citadas as mais importantes são as proteinases que serão abordadas com mais pormenor. Duma maneira geral, das lipases destaca-se a lipoproteína lipase, a qual é uma enzima pouco estável e é completamente inactivada pelo processo de pasteurização do leite (65°C, durante 30min), o seu pH óptimo encontra-se entre 8 e 9 e tendo em conta o pH do leite (6,5-6,7) ou dos produtos lácteos fermentados (~4,5) a actividade desta enzima é facilmente controlada. Nos casos da xantina oxidase e da fosfatase ácida, cujo alvo da catálise não são as proteínas, devido ao carácter mais termoestável destas enzimas, só com tratamentos térmicos mais agressivos é que estas podem ser inactivadas. A inactivação completa da xantina oxidase é conseguida com um tratamento térmico de 15 segundos a 93°C, beneficiando ainda do facto de o pH óptimo ser de 8,5, fora da gama dos leites cru e fermentado. O controlo da actividade da fosfatase ácida é um desafio maior, uma vez que o seu pH óptimo é de 4 o que faz imperar a necessidade de inactivar a enzima aquando da produção de leites fermentados. Esta inactivação pode ser conseguida com um tratamento térmico de 30min a 88°C.

De entre as proteinases destacam-se duas enzimas, a plasmina (proteinase alcalina) e a catepsina D (proteinase ácida) [3, 21]. A catepsina D, apesar de ter um pH óptimo próximo de 4, é pouco estável à temperatura e a sua completa inactivação é

conseguida com a pasteurização do leite. Por sua vez, a plasmina representa o maior desafio ao nível das enzimas endógenas do leite.

Na realidade a plasmina não está presente no leite na sua forma enzimática activa, ela está presente na forma inactiva, o plasminogénio, ambos incluídos num sistema de activadores e inibidores [21]. Qualquer dos elementos deste sistema apresenta grande termoestabilidade numa matriz com caseínas ao pH do leite e a sua completa inibição só é conseguida com tratamentos térmicos severos de 115°C por 20 min ou 120°C por apenas 15min. A actividade óptima da plasmina é registada a pH 7,5 a 35°C, contudo mesmo a temperaturas bastante reduzidas, 5°C, é possível observar um máximo de 20% de actividade desta enzima num intervalo de pH entre 4 e 9. Outro facto sobre o comportamento desta enzima em resposta aos tratamentos térmicos é que uma pasteurização HTST (*High Temperature Short Time*, 72°C durante 15s) tem como consequência o aumento da actividade da plasmina, isto porque a pasteurização HTST não inactiva a plasmina, o plasminogénio ou o activador do precursor, mas tem um efeito inactivante sobre o inibidor da actividade da plasmina e sobre o inibidor do activador do plasminogénio [3, 21]. Perante isto, a plasmina surge como uma possível fonte de proteólise endógena nos leites fermentados pois, a menos que o leite sofra previamente um tratamento térmico bastante agressivo, mesmo em armazenamento refrigerado esta enzima apresenta alguma actividade ao pH de 4,5.

1.1.2. Valor nutricional e económico dos diferentes leites

Neste sub-capítulo pretende-se analisar de forma global os três leites em estudo do ponto de vista do seu valor nutricional e também do seu impacto económico e cultural em diversos países, nomeadamente nos países mediterrânicos.

Pela revisão feita nos sub-capítulos anteriores é possível observar o potencial do leite como fonte de muitos e diversos nutrientes de elevada qualidade, por isso este alimento tem sido, e continuará a ser, consumido como parte duma dieta equilibrada, desempenhando um papel preponderante ao nível da nutrição humana. Do ponto de vista global, em particular nos países desenvolvidos, o leite de vaca e produtos derivados deste representam mais de 95% do consumo deste alimento. Contudo o consumo de leite de outras espécies, nomeadamente o leite de pequenos ruminantes, tem

particular importância nos países em desenvolvimento e também nos países localizados ao redor do mar Mediterrâneo [14, 22].

Enquanto nos países mediterrânicos o consumo de leite de cabra e ovelha está muito associado a heranças culturais e ao impacto económico de certos produtos regionais típicos, nos países em desenvolvimento o consumo destes leites surge associado a uma agricultura de dimensão familiar e também motivado pela melhor adaptação dos pequenos ruminantes, comparativamente ao gado bovino, às condições adversas do meio ambiente [23]. Devido a esta produção em pequena escala, África e Ásia são os continentes que mais contribuem para a produção mundial do leite originário de pequenos ruminantes [24]. Mas do ponto de vista económico, é na Europa e em particular na região mediterrânica que esta produção assume maior expressão.

Portugal, que surge entre os maiores produtores de leite de ovelha a nível mundial, apresenta uma grande parte da produção de leites de cabra e ovelha à escala familiar e para consumo próprio. Ainda assim, parte da produção nacional está associada à escala industrial e neste âmbito surgem alguns produtos com denominação de origem protegida que têm um elevado impacto económico. Destes destacam-se: o famoso queijo Serra da Estrela e os queijos de Azeitão, Nisa, Évora, Castelo Branco e Serpa produzidos a partir de leite de ovelha; o queijo Rabaçal e queijos picante e amarelo da Beira Baixa, obtidos a partir duma mistura de leites de cabra e ovelha; e o queijo de cabra transmontano fabricado a partir do leite de cabra [22, 25-29].

Foi já referido que o leite apresenta um elevado valor nutricional, contudo as pequenas diferenças na composição dos diferentes tipos de leite reflectem-se em grandes diferenças do ponto de vista nutricional e também ao nível tecnológico na indústria de transformação do leite [1, 8, 24]. Duma maneira geral, é fundamental referir que o leite é um alimento muito completo e importante no desenvolvimento dos mamíferos. É importante pela bioactividade presente nas suas fracções proteicas (Tabela 5) e é importante do ponto de vista estrutural pois fornece ácidos gordos e aminoácidos essenciais e também pelo papel dos resíduos de galactose como intermediários de elementos da membrana celular [3, 7].

Pela análise da Tabela 1 é bastante evidente que o leite de ovelha apresenta um maior conteúdo em nutrientes, nomeadamente no teor de proteínas e lípidos, o que implica que este é também o leite com maior quantidade de sólidos. Esta característica é

determinante na viscosidade e rigidez do coágulo obtido nos produtos lácteos fermentados, conferindo vantagem tecnológica ao leite de ovelha [1-2, 8].

Do ponto de vista da qualidade dos nutrientes presentes nos leites das três origens em estudo, foi já referido que os lípidos presentes nos leites dos pequenos ruminantes apresentam vantagens relativamente aos lípidos existentes no leite bovino devido à predominância dos SCFA e MCFA. Contudo as vantagens associadas aos lípidos não se ficam só pelo tamanho das cadeias dos ácidos gordos que contribuem para uma mais fácil digestão dos lípidos. Também as características dos glóbulos de lípidos são importantes, pois o facto de a gordura presente no leite se encontrar dispersa em glóbulos de lípidos de pequenas dimensões, como acontece nos leites dos pequenos ruminantes, aumenta a sua área de superfície e conseqüentemente a área acessível às lipases também é superior. No que diz respeito à digestão dos lípidos presentes no leite, o leite de cabra é o que merece maior destaque, não só pelo tamanho das cadeias dos ácidos gordos e dos glóbulos de gordura, mas sobretudo por estas características surgirem associadas a um menor teor de lípidos comparativamente ao leite de ovelha [2, 8].

Ainda no que respeita à fracção lipídica os ácidos capróico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) merecem destaque nos leites de pequenos ruminantes, em particular no leite de cabra. Estes três MCFA, presentes em quantidades bastantes superiores nos leites dos pequenos ruminantes, apresentam a capacidade metabólica de produzir energia ao mesmo tempo que diminuem, inibem e dissolvem os depósitos de colesterol. Estas propriedades têm se revelado uma mais-valia no tratamento de síndromes de malabsorção, distúrbios intestinais, doenças coronárias, fibrose cística e cálculos biliares [8].

Relativamente às proteínas do leite, os leites de cabra e ovelha também se apresentam em vantagem, não só pela quantidade mas também pela qualidade. No que diz respeito à alergia de determinados indivíduos ao leite de vaca, encontra-se bem estabelecido que os leites de outras origens se apresentam como uma solução a esse problema [8, 14]. Também ao nível da digestibilidade das proteínas, os leites dos pequenos ruminantes apresentam vantagens. Comparativamente ao leite bovino, as suas proteínas são mais rapidamente degradadas às suas unidades estruturais e estas são absorvidas de forma mais eficiente. Foi já demonstrado que estas diferenças na digestão

de proteínas estão por vezes associadas a configurações terciárias diferentes entre as proteínas produzidas pelos diferentes mamíferos [30].

Pelo valor nutricional dos leites de ovelha e cabra e por factores económicos e culturais adjacentes ao nosso país que foram expostos neste capítulo, é de todo o interesse realizar estudos que possam avaliar as potencialidades destes leites.

1.1.3. Leite Fermentado

O leite fermentado tem uma composição nutricional semelhante à do leite a partir do qual é obtido, embora as concentrações de vitaminas sejam eventualmente menores enquanto as concentrações de ácido láctico, galactose, aminoácidos livres, péptidos e ácidos gordos se encontram aumentadas [31-32]. Estas variações ao nível da composição do leite fermentado em comparação com o leite cru estão inteiramente ligadas ao processo de produção destes leites fermentados [5, 32].

De entre os produtos de leite fermentado os mais conhecidos entre os consumidores são os iogurtes, cujas diferentes texturas dependem inteiramente do teor de sólidos e dos processos mecânicos aplicados durante a sua produção [5, 31]. A principal diferença ao nível dos processos mecânicos aplicados na produção de iogurtes está relacionada com a agitação ou não do produto fermentado [5]. No caso dos iogurtes sólidos, que apresentam o maior teor de sólidos, o leite é fermentado pelos microrganismos fermentadores, na presença dos componentes que aromatizam o produto final e/ou frutas e já nas embalagens em que serão distribuídos aos consumidores. Nos iogurtes líquidos o leite é fermentado e só após o processo de fermentação e agitação do produto fermentado é que os aditivos são adicionados.

Em qualquer dos processos de produção dos iogurtes o passo da fermentação é fundamental. A fermentação consiste, numa forma generalista, na conversão da lactose principalmente em ácido láctico, o que resulta no abaixamento do pH a valores inferiores a 4,8 que é uma condição fundamental para que haja destabilização das micelas de caseína e se forme uma matriz sólida a partir da coagulação das proteínas [1, 5]. A fermentação é realizada por microrganismos cujo metabolismo é capaz de operar esta conversão, as denominadas bactérias lácticas (LAB). A produção de iogurte requer a utilização de duas culturas de LAB de arranque específicas, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [1, 5]. Contudo tem sido

prática comum a introdução de outras estirpes, com efeito benéfico ao nível da saúde, na produção de iogurtes ou a solo como cultura de arranque na produção de outros produtos lácteos fermentados como o leite acidófilo (leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus*) [1, 5]. Estas bactérias são denominadas de probióticos e os seus benefícios serão explorados adiante no capítulo das bactérias lácticas.

Existem outros produtos que resultam da fermentação do leite, entre os quais o queijo obtido por coagulação ácida cuja formação do coágulo é da responsabilidade da fermentação bacteriana e o kefir que resulta duma fermentação álcool-láctica por parte de bactérias lácticas e leveduras [1].

Em qualquer dos produtos resultantes da fermentação do leite ocorre a metabolização da lactose, verificando-se uma diminuição do teor de lactose no produto final acompanhada do aumento do teor de galactose [33]. Nos iogurtes e em leites fermentados com outras culturas LAB de arranque a diminuição do teor de lactose é da ordem dos 50%, isto tem como principal benefício proporcionar aos indivíduos com intolerância à lactose a possibilidade de consumir um produto com propriedades nutricionais muito próximas do leite [31-33].

Em suma, os produtos resultantes da fermentação do leite são uma fonte de nutrientes tão boa como o próprio leite e oferecem ao consumidor uma forma económica e saborosa de consumir leite e usufruir dos benefícios deste alimento, com particular ênfase nos casos de intolerância à lactose [1, 31-33]. Os leites fermentados, em particular os iogurtes, e os queijos, são os dois derivados do leite mais importantes do ponto de vista alimentar. Neste panorama os leites fermentados destacam-se pela utilização do leite inteiro, do ponto de vista proteico, uma vez que na produção de queijo algumas proteínas são perdidas no dessoramento [1]. Outro ponto que se pode apresentar vantajoso para os leites fermentados relaciona-se com os cheiros e sabores intensos dos queijos que frequentemente não agradam a muitos potenciais consumidores.

1.2. AS BACTÉRIAS LÁCTICAS (LAB)

A designação bactérias lácticas (LAB) é utilizada para referir bactérias cujo principal produto do metabolismo dos hidratos de carbono é o ácido láctico. A par com o ácido láctico, e dependendo do facto das bactérias poderem ser homofermentativas ou

heterofermentativas, podem surgir outros produtos finais como o ácido acético, o etanol e o dióxido de carbono [9]. Outras características das LAB é serem gram-positivas, não esporulantes e serem catalase negativa [34].

A classificação das LAB como homofermentativas ou heterofermentativas está relacionada com os produtos finais obtidos. No caso das homofermentativas o produto final é exclusivamente o ácido láctico. Nas LAB heterofermentativas os produtos finais são o ácido láctico a par com o ácido acético ou o conjunto ácido láctico e etanol. Os produtos finais e a classificação das LAB, não são mais do que uma consequência dos processos metabólicos adoptados por estas bactérias para produção de energia e crescimento [6, 9-10].

1.2.1. Metabolismo dos hidratos de carbono

Quando a fermentação láctica ocorre num substrato como o leite, pode considerar-se que o único hidrato de carbono disponível para ser metabolizado é a lactose. Deste modo, qualquer que seja o tipo de fermentação láctica operada pelos microrganismos responsáveis pela fermentação do leite, este processo inicia-se sempre com a hidrólise da lactose e obtenção de moléculas de glucose fosforilada no carbono na posição 6.

Nem todas as LAB têm a mesma capacidade para metabolizar a galactose e obter uma molécula de glucose-6-fosfato a partir desta, sendo a *Lactobacillus acidophilus* um exemplo da fraca utilização da galactose [35]. Mas, independentemente da capacidade de metabolização do resíduo de galactose, todas as LAB produzem, por cada molécula de lactose, pelo menos uma molécula de glucose-6-fosfato devido à fosforilação do resíduo de glucose.

No caso das LAB homofermentativas, qualquer molécula de glucose-6-fosfato obtida a partir da lactose será metabolizada pela via da glicólise até à obtenção de 2 moléculas de lactato, com ganho de 2 moléculas de ATP [6, 9-10]. Das bactérias estudadas neste trabalho, apenas a *Lactobacillus casei* e a *Lactobacillus acidophilus* apresentam um metabolismo homofermentativo [36-38].

No caso das LAB heterofermentativas, as moléculas de glucose 6-fosfato podem ser metabolizadas de dois modos distintos através da via das pentoses. Consoante a via

adoptada, os produtos finais serão: ácido acético:ácido láctico, nas proporções 3:2, caso a via adoptada seja a via metabólica das bifidobactérias que contêm a enzima específica fosfocetolase; ou ácido láctico:etanol, nas proporções 1:1, caso a via adoptada seja a via do 6-fosfogluconato [9-10].

A principal diferença entre as vias prende-se com as reacções da via das pentoses utilizadas [10]. Na via metabólica das bifidobactérias são utilizadas reacções não oxidativas na metabolização de duas moléculas de frutose-6-fosfato em duas moléculas gliceraldeído-3-fosfato e três moléculas de acetato que são depois convertidas em duas moléculas de lactato e três moléculas de acetato, com ganho 2 moléculas de ATP por molécula de glucose. Na via do 6-fosfogluconato a conversão da glucose-6-fosfato a gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato ocorre através de reacções oxidativas, e depois da conversão destes em lactato e etanol o balanço energético é de 2 moléculas de ATP. De entre as bactérias em estudo, a *Bifidobacterium animalis* e a *Lactobacillus paracasei* apresentam um metabolismo heterofermentativo e em ambas as estirpes a via adoptada é a via metabólica das bifidobactérias [36, 38-40].

De qualquer uma das três vias metabólicas possíveis, resulta sempre um decréscimo do pH devido à produção de ácido láctico e em alguns casos também devido à produção de ácido acético. Desta alteração de pH resulta a precipitação das caseínas, o que dá origem a duas fases, uma insolúvel que contém as proteínas precipitadas e outra solúvel onde estão contidas as proteínas solúveis, nomeadamente as proteínas do soro [1, 3, 12]. Se ao metabolismo energético juntarmos alguma acção proteolítica operada por proteases destas bactérias, então na fase solúvel poderão também estar presentes péptidos gerados devido à acção dessas proteases [1, 3].

1.2.2. Sistema proteolítico

Durante o crescimento as bactérias têm necessidade de uma fonte de azoto para poderem sintetizar muitas das proteínas endógenas que lhes são indispensáveis. Aminoácidos, péptidos e proteínas exógenas do meio constituem uma excelente fonte para a obtenção de aminoácidos livres. Para além da utilização como unidade estrutural na síntese de proteínas, os aminoácidos produzidos podem também ser utilizados como fonte energética, quer directamente como substrato para o metabolismo dos glícidos ou indirectamente com a regeneração de co-factores reduzidos [41-43].

No caso do crescimento das LAB em leite, a disponibilidade de aminoácidos e péptidos é reduzida. Por isso estas bactérias dependem dos seus sistemas proteolíticos, que, duma forma geral, são constituídos por proteinases, transportadores e peptidases que actuam de forma conjunta. As proteinases estão ligadas à parede celular das LAB e são responsáveis pelo início do ataque proteolítico às caseínas, obtendo a partir delas oligopéptidos que são depois transportados para dentro da célula por sistemas de transporte existentes na membrana celular. Por fim, os oligopéptidos são hidrolisados por peptidases intracelulares, nas quais se incluem as endopeptidases, as aminopeptidases, as tripeptidases e as dipeptidases com especificidades diferentes entre as várias estirpes de LAB que também diferem entre si nos aminoácidos específicos que necessitam [20, 42-44].

As proteinases ligadas à parede celular são proteinases séricas monoméricas que hidrolisam caseínas e, por clonagem e sequenciação do gene que codifica para estas enzimas (PrtP) para diversos lactococos e alguns lactobacilos, foi possível concluir que a sequência primária das proteinases do *Lactobacillus paracasei* apresenta um elevado grau de homologia com a sequência primária das enzimas presentes em *Lactococcus*, que são as que se encontram mais amplamente estudadas [43, 45-46]. O gene PrtP foi também identificado em *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* [47] mas não foi identificado na estirpe de *Bifidobacterium* estudada. No caso particular da *Bifidobacterium animalis* está documentado um estudo no qual não se identificou actividade de proteinases ligada à parede celular e cuja degradação das caseínas só foi conseguida por acção da fracção citoplasmática [48].

No que se refere às estirpes de lactococos sabe-se que o domínio catalítico está localizado no terminal N e contém vários resíduos conservados que estão envolvidos na catálise e no posicionamento do substrato. Estudos realizados com proteinases de bactérias deste género permitiram definir sete grupos de proteinases, de acordo com a especificidade para os substratos e identificar as possíveis substituições de aminoácidos responsáveis pelos diferentes fenótipos observados. Estas substituições de aminoácidos são o resultado de pequenas variações genéticas no gene PrtP, entre as quais se pode encontrar um domínio catalítico altamente conservado, não só entre as estirpes de lactococos, mas também ao nível das estirpes de lactobacilos [43]. No caso do *Lactobacillus paracasei*, apenas duas posições consideradas relevantes para a catálise e

ligação do substrato são diferentes daquelas encontradas para um dos fenótipos do *Lactococcus lactis* [45].

No que diz respeito ao local de corte das proteinases não é possível definir inequivocamente um local de corte, embora por análise dos produtos de hidrólise de diferentes proteinases seja possível observar alguma preferência por determinados locais de corte. No caso da β -caseína é possível observar que entre as posições 160-170 e 190-195 a grande maioria das ligações peptídicas são hidrolisadas por qualquer tipo de proteinases, enquanto noutras posições a quebra das ligações ocorre de forma fortuita. Esta observação poderá dever-se à especificidade das proteinases ou ser apenas um reflexo da acessibilidade aos diferentes resíduos de aminoácidos na estrutura tridimensional da molécula de caseína [43].

Relativamente aos sistemas de transporte existentes na membrana celular são conhecidos três sistemas diferentes inicialmente identificados em *Lactococcus lactis* [43, 47]. Dois deles pertencem à superfamília dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e são responsáveis pelo transporte de oligopéptidos (sistema Opp) e di-/tripéptidos (sistema Dpp) acoplado à hidrólise de ATP. O terceiro sistema é um sistema de transporte de di-/tripéptidos (sistema Dtp) que realiza o transporte acoplado a um fluxo de iões. Sabe-se que o *Lactobacillus acidophilus* e o *Lactobacillus casei* possuem os três sistemas de transporte [47]

O sistema Opp é responsável pelo transporte de oligopéptidos com um máximo de 10 resíduos, enquanto os outros dois sistemas são responsáveis pelo transporte de péptidos com dois ou três resíduos. Se os di-/tripepéptidos forem hidrofóbicos são transportados através do sistema Dpp, enquanto o transporte de di-/tripéptidos com características hidrofílicas é da responsabilidade do sistema Dtp [43].

No que diz respeito às peptidases encontradas em *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., as diferentes aminopeptidases, endopeptidases e di- e tripeptidases, bem como as peptidases capazes de hidrolisar resíduos de prolina, estão discriminadas na Tabela 6. Nesta tabela é ainda possível encontrar informação sobre os locais de corte e algumas particularidades de determinadas peptidases.

Tabela 6 – Resumo das peptidases encontradas em LAB. Adaptado de Christensen. et al, Kunji et al e Liu et al [42-43, 47].

Peptidase	Local de corte	Anotações	
Aminopeptidase	PepN	X (X) _n	Ambas não são capazes de clivar dipéptidos que contenham Pro e a principal diferença entre a PepN e a PepC é a capacidade da primeira quebrar substratos de maiores dimensões (até 10 resíduos)
	PepC	X (X) _n	
	PepM	Met (X) _n	Hidrolisa preferencialmente dipéptidos e alguns tripéptidos É capaz de libertar resíduos ácidos de péptidos com mais de 10 resíduos e hidrolisa dipéptidos Ser X quando o aminoácido X é hidrofóbico ou aromático
	PepL	Leu (X) _n	
	PepA	Glu/Asp (X) _n	
Tripeptidase	Pep T	X X-X	Quebra exclusivamente tripéptidos desde que estes não contenham Pro na 2ª posição
Dipeptidase	PepD	X X	É incapaz de hidrolisar os dipéptidos Val X (X:Arg, Gly,Leu) e Ile X (X:Gln, Val) Geralmente não hidrolisa dipéptidos com Gly no terminal N
	PepV	X X	
Endopeptidase	PepE/ PepG	(X) _m (X) _n	Hidrolisa péptidos com 5 a 35 resíduos Hidrolisa péptidos com 7 a 17 resíduos
	PepO	(X) _m (X) _n	
	PepF	(X) _m (X) _n	
Peptidase de prolina	PepX	X-Pro (X) _n	As sequências X-Pro-Pro-(X) _n não são clivadas mas a PepX consegue clivar em locais específicos que não contém Pro, como por exemplo a sequência do fragmento 176-182 da β-caseína: Lys-Ala Val-Pro Tyr-Pro Gln
	PepI	Pro X-(X) _n	
	PepR	Pro X	Não hidrolisa di-/tripéptidos com esta sequência
	PepP	X Pro-(X) _n	
	PepQ	X Pro	

Legenda: X – representa qualquer aminoácido.

Dum modo geral é possível encontrar em todos os genomas das LAB utilizadas na produção de laticínios, as aminopeptidases Pep C, Pep N e Pep M. Também estão

presentes nestes genomas as peptidases de prolina Pep X e Pep Q, a dipeptidase PepV e a endopeptidase Pep O [44, 47].

No *Lactobacillus acidophilus* é possível encontrar todas as peptidases documentadas na Tabela 6, enquanto o *Lactobacillus casei* não apresenta código genético para aminopeptidase PepA, a tripeptidase PepT e a peptidase de prolina Pep I [47]. A inexistência destas três peptidases poderá ter implicações na forma como os oligopéptidos são degradados, pois esta bactéria carece de peptidases capazes de libertar resíduos ácidos e resíduos de prolina do terminal N, e é ainda incapaz de degradar a grande maioria dos tripéptidos. Contudo, é de realçar que as peptidases no *Lactobacillus paracasei* ainda não estão inteiramente caracterizadas; estudos recentes documentam a actividade das aminopeptidases, endopeptidases e dipeptidases [49-52]. No caso da *Bifidobacterium animalis* a caracterização das suas peptidases também é parca. Mas, o mesmo estudo que documenta a inexistência de proteinases nesta estirpe, coloniza e expressa o gene para a endopeptidase PepO fazendo depois uma caracterização desta peptidase. Neste estudo conclui-se que esta peptidase consegue clivar substratos com mais de 5 resíduos, como descrito para grande parte das LAB, e não tem actividade em substratos com 64 resíduos nem em proteínas [48].

Desta proteólise resultam por vezes péptidos que são funcionais a nível biológico, os chamados péptidos bioactivos [53]. Devido à especificidade das peptidases de cada estirpe os péptidos obtidos dependem largamente das bactérias e das condições físicas utilizadas durante o processo de fermentação [17, 42].

Outro factor que afecta largamente a produção de péptidos bioactivos é o tempo, pois durante o processo de proteólise há formação de péptidos e aminoácidos para consumo por parte das bactérias. É do balanço entre os péptidos formados e os péptidos consumidos que resultam os péptidos bioactivos, e por isso o perfil de péptidos numa amostra de leite fermentado varia ao longo do tempo [34].

1.2.3. Simbióticos

Por definição, o conceito de simbiótico refere-se a uma mistura de probióticos e prebióticos que afectam de forma benéfica o hospedeiro através da promoção da sobrevivência e implantação de organismos vivos fornecidos como suplementos dietéticos no tracto gastrointestinal do hospedeiro [54].

1.2.3.1. Probióticos e Prebióticos

Por definição um probiótico é um microrganismo vivo que, quando consumido em quantidades adequadas, produz um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro [55]. Um próbiotico deverá ser um microrganismo não patogénico e cuja viabilidade se mantenha durante o processamento, o armazenamento e a digestão gastrointestinal [56]. As bactérias em estudo estão documentadas como probióticos [38, 57-59], exercendo diferentes benefícios no organismo.

Os benefícios documentados para os probióticos são, entre outros: a diminuição da intensidade de respostas alérgicas, a diminuição da intolerância à lactose, a actividade antagonista contra agentes infecciosos, a prevenção de cáries dentárias, a prevenção do desenvolvimento de carcinomas, a imunomodulação, a promoção de uma melhor digestão gastrointestinal e a redução do colesterol [60-63]. Os benefícios da responsabilidade das LAB probióticas em estudo estão resumidos na Tabela 7.

Uma vez que os probióticos produzem efeitos benéficos para a saúde como elementos da microflora intestinal, há todo o interesse em proporcionar-lhes as condições para que estes se mantenham viáveis para colonizar o intestino [56]. No sentido de responder a esta necessidade surgem os prebióticos [64].

Por definição, prebióticos são ingredientes alimentares que afectam de forma benéfica a saúde do hospedeiro através da estimulação selectiva do crescimento e/ou da actividade de um número limitado de bactérias presentes no cólon [64]. Para que um ingrediente alimentar possa produzir um estímulo no crescimento e/ou actividade metabólica da parte da microflora intestinal, este ingrediente deverá atravessar a parte superior do tracto gastrointestinal sem ser hidrolisado ou absorvido e deverá ser um substrato selectivo para um ou um número limitado de microrganismos benéficos presentes no cólon [64]. Quando consideramos a veiculação dos prebióticos através de alimentos funcionais, os ingredientes deverão ainda resistir ao processamento do alimento [65].

Actualmente a maioria dos prebióticos e candidatos a prebióticos são oligossacarídeos que não são digeridos pelo sistema gastrointestinal humano. Estes e a inulina, um polissacarídeo de frutose, são os mais estudados e a sua resistência à digestão gastrointestinal e ao processamento alimentar está bem estabelecida [65-66]. Contudo para que possam ser usados como prebióticos é ainda necessário estabelecer o

efeito estimulante que estes têm sobre as bactérias capazes de colonizar o cólon, com particular interesse pelos microrganismos probióticos. No sentido de aliar o potencial dos prebióticos ao probióticos surge o conceito de simbiótico.

Tabela 7 – Resumo dos benefícios na saúde do hospedeiro exercidos pelas bactérias probióticas a usar neste estudo.

Bactéria	Benefício na saúde do hospedeiro	Ref.
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Efeito antimutagénico Efeito preventivo em infecções por <i>Helicobater pylori</i> Estimulação do sistema imunitário Prevenção de diarreias virais Modulação da flora intestinal Tratamento de obstipação Alívio de sintomas de dermatite atópica, em crianças	[38, 58]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Efeito antimutagénico e anticancerinogénico Diminuição dos níveis de colesterol Efeito preventivo em infecções por <i>Helicobater pylori</i> Estimulação do sistema imunitário Modulação da flora intestinal	[38, 58, 63]
<i>Lactobacillus casei</i>	Diminui intolerância à lactose Efeito antimutagénico Diminuição dos níveis de colesterol Efeito preventivo em infecções por <i>Helicobater pylori</i> Estimulação do sistema imunitário Modulação da flora intestinal Diminuição da actividade de enzimas fecais	[38, 57-58, 63]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Diminui intolerância à lactose Estimulação do sistema imunitário	[57-58]

De modo a avaliar a potencialidade dos prebióticos para estimular o crescimento de alguns probióticos, têm sido desenvolvidos alguns estudos onde se compara o número de células viáveis quando o crescimento da estirpe probiótica ocorre na presença e na ausência do prebiótico. Alguns destes estudos avaliam ainda o efeito da adição do prebiótico em parâmetros como os produtos finais do metabolismo dos

açúcares, a proteólise e/ou a lipólise que podem funcionar como um bom indicador para o estímulo do metabolismo bacteriano [61, 67-70]

Estudos realizados com o *Lactobacillus acidophilus* [61, 67-68, 70] documentam o aumento do número de células viáveis aquando da utilização de inulina e/ou oligofrutose como prebióticos. Alguns destes estudos mostram ainda que uma combinação destes prebióticos induz um aumento da proteólise [61].

No que diz respeito à *Lactobacillus paracasei*, também é possível encontrar documentado um aumento do número de células viáveis aquando do crescimento na presença de inulina e/ou oligofrutose [68, 70]. E o mesmo é válido para a *Bifidobacterium animalis* [67-68, 70] e para a *Lactobacillus casei* [67, 69].

1.2.3.2. Leites fermentados como veículo de probióticos

Os produtos lácteos fermentados, em particular os produtos tipo iogurte, são os alimentos mais utilizados como veículo para ingestão de probióticos. Este estatuto deve-se a uma conjuntura favorável do ponto de vista do consumidor e do ponto de vista tecnológico [5, 14]. Por um lado os consumidores já atribuem um carácter saudável aos iogurtes e já estão familiarizados com a ideia que estes contêm microrganismos vivos responsáveis pela fermentação e que não são patogénicos. Deste modo, a ideia dos probióticos utilizados como cultura de arranque responsáveis pela fermentação e com acréscimo para o benefício ao nível da saúde é bem aceite e promove o consumo diário de probióticos. Por outro lado, a matriz dos leites fermentados tem sido optimizada para permitir a viabilidade dos organismos fermentadores e, atendendo às características tecnológicas de inúmeros probióticos, pouca é a adaptação tecnológica necessária para garantir a sobrevivência destes microrganismos e este poderá ser um factor determinante ao nível industrial para a utilização dos leites fermentados como veículos para o consumo de probióticos.

Na incorporação dos probióticos em leites fermentados é fundamental que, durante o processo de produção e tempo de prateleira, se atenda à necessidade de manter as bactérias viáveis e em número suficiente para garantir uma vantagem do produto com probiótico comparativamente ao produto fermentado tradicional [5]. Além destes critérios, a adição de probióticos a um produto lácteo fermentado não deve

afectar de forma negativa o sabor e a textura do produto nem promover a acidificação deste durante o tempo de prateleira [56].

A viabilidade do probiótico na matriz do leite fermentado é o resultado da combinação de diversos factores, entre os quais se destacam: o pH do meio, o sistema proteolítico das bactérias probióticas, as interacções entre os diferentes microrganismos e a disponibilidade de nutrientes na matriz, esta última dependente da composição do leite e do grau de hidrólise das proteínas e dos lípidos [5, 56].

A disponibilidade de nutrientes é dependente da capacidade de metabolização dos nutrientes presentes no leite por parte das bactérias presentes na matriz. Atendendo à possibilidade de na matriz poderem estar presentes os probióticos isolados, a sua capacidade de sobreviver e da sua população atingir uma dimensão significativa para oferecer os benefícios dos probióticos aos consumidores é inteiramente dependente da sua capacidade de hidrolisar os nutrientes do leite. Nestes casos, não existe interacções entre bactérias a considerar, mas pode ser necessário suplementar o leite com hidrolisados de proteínas como fonte de azoto disponível, particularmente enquanto os sistemas proteolíticos não estão em plena actividade [56].

Nos casos em que o microrganismo probiótico é introduzido em combinação com outras culturas de arranque, a disponibilidade de nutrientes é o resultado duma interacção entre as diferentes capacidades de metabolização das diferentes culturas presentes. Nestes casos é importante considerar a interacção entre espécies, em particular os produtos do metabolismo de todas as espécies e de que forma isso afecta o crescimento das diversas bactérias presentes [56]. Da interacção entre os microrganismos do leite fermentado pode resultar: um sinergismo que acelera o crescimento de ambas as estirpes; ou um antagonismo que resulta da produção de substâncias por parte duma bactéria que inibe o crescimento doutra, pondo em causa o crescimento do probiótico ou o desenvolvimento das culturas de arranque o que implica a não obtenção da acidificação necessária à produção da matriz sólida nem a disponibilização de fontes de azoto adequadas [5].

A incorporação da estirpe probiótica pode acontecer antes ou depois da fermentação, dependendo da sua influência no processo fermentativo e do processo de fabrico do leite fermentado. Quando a estirpe probiótica é adicionada a solo, esta tem um papel preponderante na fermentação do leite e a sua adição ocorre necessariamente

antes do processo fermentativo e é fundamental para que este ocorra. Nos casos em que a estirpe probiótica é adicionada em conjunto com culturas de arranque, o momento em que o probiótico é adicionado ao leite fermentado é muitas vezes determinado pelo produto final e o seu processo de produção. Normalmente, quando o produto final é do tipo iogurte líquido ou iogurte batido e o microrganismo probiótico não tem um papel activo na fermentação do leite, este só é adicionado após a fermentação, o que diminui as interacções entre as diferentes estirpes presentes no produto. Quando o produto é do tipo iogurte sólido, como este não sofre agitação após a fermentação, o agente probiótico tem de estar presente no momento da fermentação, quer participe ou não no processo. A necessidade de introdução do probiótico antes da fermentação aumenta as interacções entre o probiótico e as culturas de arranque, podendo originar mais problemas ao nível da combinação das estirpes. Perante isto, pode afirmar-se que os leites fermentados que incluem agitação após a fermentação no seu processo de fabrico são tecnologicamente mais apropriados para a introdução de probióticos na sua matriz [5].

Independentemente do momento em que o probiótico é adicionado ao leite e da sua participação ou não no processo fermentativo, para que o microrganismo probiótico tenha influência benéfica sobre a saúde do consumidor, durante o período de armazenamento, o produto deverá apresentar contagens entre 10^6 e 10^7 unidades formadoras de colónias (do inglês *colony forming units*, CFU) por grama de leite fermentado de modo a garantir a ingestão diária de 10^8 a 10^9 células viáveis quando 100g de leite fermentado são ingeridas [35, 56].

Em suma, pode concluir-se que da fermentação de leites com estirpes de LAB resulta sempre uma mudança na matriz provocada pelo abaixamento do pH e, dependendo da capacidade proteolítica e do potencial probiótico das estirpes, poderão ainda obter-se efeitos benéficos para a saúde, quer ao nível da produção de péptidos bioactivos ou ao nível da acção destas bactérias como probióticos [14, 17].

1.3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Péptidos bioactivos são fragmentos de proteínas específicas, que têm um impacto positivo nas funções ou condições do organismo e podem, em última análise, influenciar a saúde [71]. Geralmente, estes fragmentos têm entre 2 e 20 resíduos de

aminoácidos e por vezes são funcionais para mais do que uma actividade biológica [19, 53]. A libertação destes péptidos pode ocorrer por processos de fermentação com bactérias, hidrólise com enzimas proteolíticas, digestão gastrointestinal, ou combinação da digestão gastrointestinal com uma das outras duas. Na Figura 8 é visível que a combinação das duas fontes de hidrólise proteica (digestão + fermentação) potencia a libertação dum maior número de péptidos bioactivos [53].

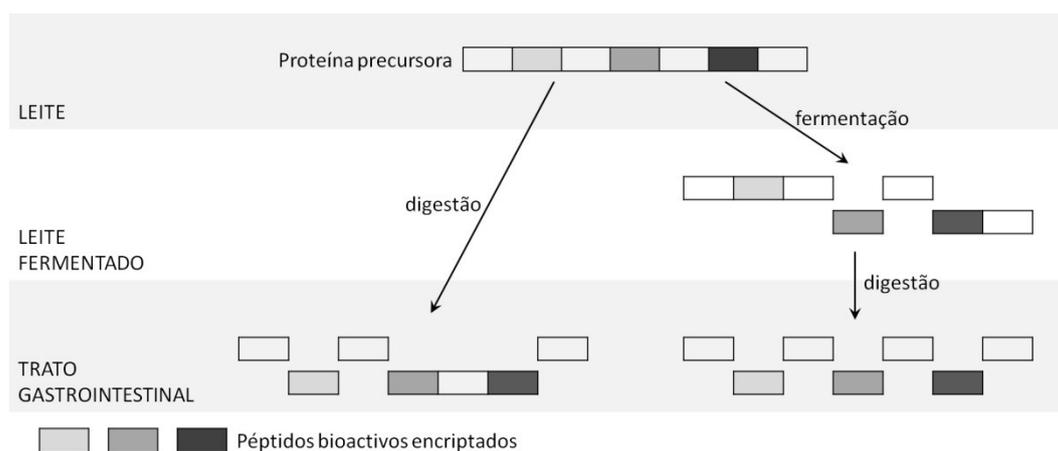


Figura 8 – Esquema da libertação de péptidos bioactivos e possíveis diferenças entre a fragmentação da proteína através de fermentação e/ou digestão gastrointestinal. Adaptado de Moller et al [53].

O leite é uma das melhores fontes de proteínas precursoras de péptidos bioactivos, embora estes também possam ser obtidos a partir de outras fontes (ovos, milho, soja, arroz, alguns peixes, entre outros) [53].

No sentido de identificar os péptidos bioactivos encriptados nas proteínas do leite têm sido realizados inúmeros estudos, nos quais foram usadas diversas matrizes (exemplos: leites fermentados, iogurtes, queijos, gelados) e diferentes estirpes de bactérias. Nestes estudos são documentadas várias actividades biológicas da responsabilidade dos péptidos bioactivos, entre as quais as actividades anti-hipertensiva e antioxidante, que se pretendem estudar neste trabalho, e ainda actividades antimicrobiana, imunomoduladora, opióide, antitrombótica, osteoprotectiva, anticancerígena e de transporte de minerais [2, 18, 53, 72-74].

1.3.1. Identificação de péptidos bioactivos em leites fermentados

Apesar das várias matrizes utilizadas para estudar a produção de péptidos bioactivos, neste trabalho focar-se-á a obtenção de péptidos a partir da fermentação de leites de cabra, ovelha e vaca com bactérias probióticas das estirpes *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*.

Pode considerar-se que a nível experimental a identificação de péptidos bioactivos compreende três fases. Numa primeira fase obtêm-se os leites fermentados com uma ou um conjunto de bactérias seleccionadas; numa segunda fase avalia-se o potencial dos péptidos formados através do estudo da extensão da proteólise e de testes para avaliar se os leites fermentados produzidos têm actividade biológica; por fim, numa terceira fase procede-se ao isolamento e identificação dos péptidos [52, 75-84].

1.3.1.1. Obtenção dos leites fermentados

Na obtenção dos leites fermentados o procedimento geral é a inoculação das bactérias em skim milk reconstituído [52, 79, 83] ou leite cru previamente sujeito a tratamento térmico [75, 78, 80]. Outra forma de obter leites fermentados é através da aquisição de produtos lácteos fermentados disponíveis no mercado [82].

O tratamento térmico do leite é feito normalmente durante 30 minutos com temperaturas que podem ir desde os 73°C até ao 95°C, observando-se por vezes a diminuição do tempo do tratamento quando este é realizado a 95°C [75, 78, 80]. Este tratamento térmico é importante do ponto de vista de segurança microbiológica, pois permite eliminar as bactérias patogénicas não-esporulantes, e também do ponto de vista tecnológico pois provoca a desnaturação das proteínas do soro o que aumenta a sua capacidade de ligação à água e promove a formação duma matriz sólida de complexos entre as proteínas do soro e as caseínas, evitando assim a ocorrência de fenómenos de sinérese [1]. Outro aspecto importante do tratamento térmico prende-se com a criação dum ambiente estéril para favorecer o crescimento das culturas fermentadoras através da eliminação da competição por nutrientes por parte de outras bactérias [5].

As bactérias podem ser obtidas de culturas comerciais [52, 75-76, 78, 80-81] ou isoladas e identificadas a partir de leite cru ou produtos lácteos disponíveis no mercado [83, 85]. Qualquer que seja o método de obtenção das bactérias, é procedimento geral reactivar os microrganismos através de crescimento em culturas de MRS broth e/ou

skim milk reconstituído, antes de proceder à sua inoculação no leite. A quantidade de inóculo utilizado para produção dos leites fermentados é normalmente de 1% (v/v) [52, 76, 78, 80], mas pode variar [75, 81, 85].

O processo de fermentação pode decorrer a temperaturas entre os 30°C e ao 42°C [52, 78, 80], sendo os 42°C o procedimento padrão para a preparação de iogurtes (leites fermentados com as culturas de arranque do iogurte, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) [86]. Normalmente o fim da fermentação ocorre quando se atinge o pH de 4,5 [36, 75, 78, 80, 87], contudo em diversos trabalhos a fermentação decorre durante um tempo definido [52, 79, 85], procedendo-se por vezes ao ajustamento do pH para obtenção do pH 4,5 [81].

Após a fermentação pode iniciar-se os estudos para avaliar a presença de potenciais péptidos [75-76, 83], mas o armazenamento a 4°C pelo período de aproximadamente um mês aliado à obtenção de amostras a diferentes tempos de armazenamento é um procedimento comum [78, 80]. É importante que após a fermentação e durante o período de armazenamento se monitorize o número de células viáveis, o que é frequentemente feito através da inoculação em placa de diluições decimais preparadas a partir duma alíquota da amostra de leite fermentado [36, 52, 78, 80, 85].

1.3.1.2. Avaliação da extensão da proteólise

Um dos procedimentos mais importantes para avaliar o potencial dos leites fermentados, no que diz respeito à produção de péptidos, é o estudo da extensão da proteólise. Neste procedimento destacam-se três metodologias: electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) [88-90], a determinação com *o*-ftaldialdeído (OPA) [79, 81, 85, 87] e o método de Kjeldhal [61, 70].

As PAGE em geral, e a Tricina-SDS-PAGE (Electroforese em gel de poliacilamida com dodecil-sulfato de sódio e tricina) em particular, são técnicas que permitem separar as proteínas. A utilização de tricina proporciona uma maior resolução para pesos moleculares abaixo do 30kDa, o que ao nível das proteínas do leite permite uma melhor separação das suas proteínas mais abundantes (caseínas, α -lactalbumina e β -lactoglobulina) [91]. Em termos práticos este método fornece um gel com as proteínas separadas e cuja intensidade óptica de cada banda é proporcional à concentração

daquela proteína na amostra. Ao nível da avaliação da proteólise esta técnica permite observar a diminuição da quantidade de uma proteína relativamente a uma amostra controlo [89-90].

A determinação com *o*-ftaldialdeído (OPA) é uma técnica que se baseia na quantificação dos grupos α -amina livres. Nesta técnica o OPA reage com os grupos α -amina formando aductos que têm elevada absorvância ao comprimento de onda de 340nm [92]. Em termos práticos, a determinação da extensão da proteólise com OPA dá-nos uma quantificação relativa da concentração dos péptidos e aminoácidos, que pode ou não ser estimada com recurso a uma curva padrão, e serve como medida da extensão da proteólise por comparação com um controlo [81, 85].

O método de Kjeldahl é uma forma de quantificar indirectamente a quantidade de proteína total através da determinação directa da quantidade de azoto e aplicação de um factor de conversão a esta determinação. Este procedimento compreende 3 passos: digestão, destilação e titulação. No processo de digestão o azoto orgânico é convertido em sulfato de amónio que é depois convertido em amoníaco e recolhido em ácido bórico, sob a forma de amónia, no processo de destilação. Por fim realiza-se uma titulação para quantificar a quantidade de ácido bórico desprotonado no processo de conversão do amoníaco em amónia, permitindo a determinação da quantidade de azoto na amostra analisada [93].

Para aplicar este método às proteínas do leite é preciso ter em consideração que este método determina a quantidade total de azoto orgânico e no caso do leite este não corresponde exclusivamente à fracção das proteínas. No leite as fontes de azoto são, para além das proteínas, aminoácidos livres, glicosídeos nitrogenados, fosfolípidos e ácidos nucleicos [93]. Estes têm ainda uma maior expressão se considerarmos o total da matriz de leites fermentados onde estão incluídos os microrganismos fermentadores. Para resolver esta falta de especificidade adoptou-se um método em que se faz fraccionamento da matriz do leite fermentado, obtendo-se assim uma fracção solúvel a partir da qual se procede à precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (TCA). Deste modo, quantificando a fracção solúvel temos a quantificação de todo o azoto orgânico presente na matriz e que é solúvel em água (do inglês *water soluble nitrogen*, WSN), no qual se incluem as proteínas. Ao fazer a precipitação com TCA e remoção do precipitado, removemos as proteínas do WSN e obtemos uma fracção que contém todo

o azoto que é solúvel em TCA, do qual não fazem parte as proteínas. Ao quantificar esta fracção passamos a ter a quantidade de azoto não-proteico (do inglês *nonprotein nitrogen*, NPN) que estava contido na fracção solúvel e assim obter a quantidade de proteína da nossa amostra [93].

Em termos práticos, quando quantificamos as fracções de WSN e NPN para uma amostra temos a quantidade de proteína desta amostra e temos ainda um indicador da extensão da proteólise através das variações das quantidades de proteína [61, 70].

1.3.1.3. Determinação da actividade biológica

Embora o estudo da extensão da proteólise seja um procedimento importante, no que diz respeito à determinação do potencial bioactivo dos péptidos formados, o passo fulcral é o desenvolvimento de estudos experimentais que permitam avaliar o efeito dos péptidos presentes na amostra sobre determinada actividade biológica. Neste sentido e no âmbito deste trabalho serão revistas as metodologias mais frequentemente utilizadas para a determinação *in vitro* do potencial anti-hipertensivo e antioxidante de leites fermentados.

1.3.1.3.1 Actividade anti-hipertensiva

A identificação de péptidos com actividade anti-hipertensiva tem merecido especial destaque. Este destaque está relacionado com a prevalência e a importância da hipertensão como principal factor de risco controlável nas doenças cardiovasculares e com os péptidos anti-hipertensivos almeja-se diminuir os custos com a saúde ao encontrar um agente hipotensivo natural que não provoque os efeitos adversos observados com os inibidores sintéticos da enzima conversora da angiotensina, como é o caso do captopril [14, 94].

Ao nível fisiológico a actividade anti-hipertensiva manifesta-se pela diminuição da tensão arterial. O principal mecanismo do organismo para modular a pressão sanguínea é o sistema renina-angiotensina, o qual responde a um estímulo de valores de pressão reduzidos produzindo um aumento da pressão arterial. Neste sistema o aumento da pressão é conseguido através dum mecanismo mediado pela conversão da angiotensina I em angiotensina II, que é catalisada pela enzima de conversão da angiotensina I (ECA) e em última análise promove o aumento da tensão arterial através

da vasoconstrição [71]. A inibição da ECA tem então como consequência a inibição do sistema renina-angiotensina e desempenha deste modo uma actividade anti-hipertensiva.

No estudo dos péptidos com actividade anti-hipertensiva têm sido três as metodologias mais utilizadas e todas elas têm em comum a utilização da inibição da enzima que catalisa a conversão da angiotensina (ECA) como medida para a actividade anti-hipertensiva dos péptidos bioactivos [95-97] e partilham uma base comum, a adição de uma porção da amostra contendo o péptido formado a um reagente que contém a ECA e um substrato que é degradado pela enzima.

No método mais antigo e mais amplamente utilizado [75-76, 78-79, 82-83, 85, 87], o método desenvolvido por Cushman & Cheung [95], o substrato utilizado é o hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) que é catalisado a ácido hipúrico pela ECA, durante um período de incubação a 37°C de no mínimo 30 minutos [75, 79, 81-83, 85] até ao máximo de 1 hora [76, 78]. Após o período de incubação a reacção é terminada com a adição de HCl e de seguida procede-se à extracção do ácido hipúrico com acetato de etilo, deixando-se secar por evaporação a vácuo e de seguida é dissolvido em água destilada e quantificado por espectrofotometria com leituras ao comprimento de onda de 228nm. Um método de extracção diferente foi utilizado por Su et al [83] que utiliza uma coluna de HPLC para eluir o ácido hipúrico que foi quantificado por monitorização do eluído a 228nm.

Um segundo método de quantificação foi desenvolvido por Holmquist et al [96] e difere do primeiro ao nível do substrato, que é agora o N-[3-(2-Furil)acrilil]-L-fenilalanil-glicil-glicina, e no facto de monitorizar a actividade da enzima ao longo do tempo e não através da quantidade de produto final obtido. Neste caso a incubação da enzima ocorre a 37°C, mas durante um período de 25 minutos no qual a absorvância a 340nm é registada de 30 em 30 segundos. Os dados são representados graficamente e a actividade da enzima é dada pelo declive da recta linear obtida durante 15 minutos [80-81].

O terceiro e último método é mais recente e foi desenvolvido por Sentandreu & Toldrá [97]. Neste método o substrato é Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro que é hidrolizado pela ECA em *o*-aminobenzoilglicina (Abz-Gly) que é um substrato fluorogénico e pode ser detectado com um fluorímetro. Após incubação do substrato com a enzima por 30

minutos a 37°C, detecta-se a emissão de fluorescência ao comprimento de onda de 420nm depois da devida excitação do substrato a 350nm [98].

De entre os três métodos apresentados, o descrito por Cushman & Cheung [95] é compreensivelmente o mais utilizado, pois apesar de ser dos três métodos aquele que implica mais manipulação é também, por oposição, aquele que requer o aparelho mais acessível para monitorização da reacção, um espectrofotómetro. Os métodos descritos por Holmquist et al [96] e Sentandreu & Toldrá [97], apesar de terem uma manipulação mais simples, requerem um espectrofotómetro termostaticado ou um fluorímetro, podendo a existência destes aparelhos ser um factor limitante à utilização das técnicas.

A actividade anti-hipertensiva é expressa em IC₅₀, que é a concentração de péptido necessária para inibir 50% da actividade da ECA. Em qualquer dos métodos, por representação gráfica da relação entre a percentagem de inibição e a concentração de péptido, obtém-se uma regressão linear a partir da qual se pode determinar a concentração necessária para reduzir a actividade da enzima a metade [83, 97, 99].

A determinação do IC₅₀ para estes péptidos, embora seja uma forma de avaliar o seu potencial, não é a melhor forma de estudar o seu efeito *in vivo*. No sentido de mimetizar o efeito *in vivo* dos péptidos têm sido desenvolvidos estudos com ratos espontaneamente hipertensivos (SHR) aos quais são administradas doses controladas do péptido e monitorizada a acção que este tem sobre as pressões sistólica e diastólica [81, 85]. Para os tripéptidos melhor estudados, IPP e VPP, foram já realizados estudos em humanos. Nestes estudos, foram administradas a indivíduos hipertensivos doses controladas destes péptidos e avaliada a acção sobre a sua tensão arterial [100-101]. Os resultados obtidos para os testes *in vivo*, numa forma geral, estão de acordo com as actividades encontradas para os péptidos, contudo os valores de IC₅₀ não parecem ser uma medida fiável da dimensão da inibição *in vivo*. Por comparação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* dos mesmos péptidos, foi possível observar que os péptidos com maiores valores de IC₅₀ eram capazes de produzir um maior abaixamento da tensão arterial em comparação com outros péptidos com IC₅₀ menor [102].

Outro resultado interessante é o facto de a soma das actividades individuais de cada fracção ser menor que a actividade da amostra inteira [85]. Embora não seja possível apresentar uma justificação para tal facto, este resultado poderá ser uma consequência de perdas de péptidos durante o fraccionamento ou uma evidência da acção sinérgica

dos diferentes péptidos da amostra. Esta última hipótese é corroborada por um outro estudo no qual se obtém menor índice de actividade para péptidos obtidos por síntese em comparação com os péptidos contidos na fracção da amostra [76].

Os péptidos com esta actividade inibitória sobre a ECA são normalmente ricos em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e com um resíduo de prolina, lisina ou arginina no terminal carboxílico [71].

1.3.1.3.2 Actividade antioxidante

Para compreender a actividade antioxidante é necessário primeiro conhecer a actividade oxidante. Em termos fisiológicos o stress oxidativo representa a actividade oxidante do organismo e é uma condição em que o balanço entre os agentes oxidantes e os agentes antioxidantes está desajustado a favor dos agentes oxidantes [103].

Os agentes oxidantes, quando balanceados, desempenham papéis importantes nas vias de sinalização e na resposta imunitária. Quando em excesso, como são muito reactivos, tendem a atacar quaisquer biomoléculas ao seu alcance provocando danos ao nível celular, que se pensa estarem envolvidos no aparecimento e desenvolvimento de várias doenças, tais como o cancro, a diabetes tipo 2 e as complicações cardiovasculares em pacientes com síndrome metabólica [103].

Pela relação estabelecida entre a condição de stress oxidativo e a deterioração da saúde humana é de especial importância controlar esta condição como forma de desacelerar o progresso de inúmeras doenças, bem como prevenir o aparecimento de complicações a elas associadas [103]. Neste sentido surgem em destaque os antioxidantes.

Um antioxidante, do ponto de vista de protecção do organismo, é uma molécula capaz de reagir com os agentes oxidantes formando uma molécula estável que não degradará as biomoléculas. Os péptidos, ao apresentarem actividade antioxidante, actuarão como antioxidantes *in vivo* [103].

O mecanismo de acção dos péptidos antioxidantes e a relação entre a actividade e a estrutura do péptido não se encontram bem definidos. Contudo a actividade destes tem-se manifestado na inibição da peroxidação lipídica, na estabilização de radicais livres e como quelante de iões de metais de transição [103]. Encontra-se também

documentada a actividade antioxidante dos péptidos através de indução genética, contudo a actividade destes péptidos está muito relacionada com a sua composição, estrutura e hidrofobicidade. Os aminoácidos aromáticos, os hidrofóbicos e a cisteína são característicos da actividade antioxidante. A cisteína funciona como oxidante na medida em que oxida grupo SH de forma reversível, por sua vez os resíduos aromáticos manifestam a sua actividade antioxidante estabilizando a espécie reactiva através da cedência de um electrão. A hidrofobicidade é uma característica importante do ponto de vista da peroxidação lipídica, pois confere solubilidade no meio lipídico.

A par com o conteúdo em aminoácidos a ligação peptídica e/ou propriedades estruturais dos péptidos poderá ter uma grande influência na capacidade antioxidante. Esta característica pode funcionar como uma “faca de dois gumes” pois nuns casos aumenta a capacidade antioxidante e noutros casos tem um efeito negativo sobre a manifestação desta actividade, inclusivamente poderá manifestar uma actividade pró-oxidante [103]. A actividade dos péptidos também é influenciada pela conformação (L ou D) dos aminoácidos. Outro factor que pode também contribuir para a variabilidade da actividade determinada nos péptidos é o método de análise utilizado [104].

Com o objectivo de determinar a actividade antioxidante dos péptidos, dois tipos de métodos podem ser utilizados, os métodos baseados na transferência dum átomo de hidrogénio (métodos de HAT) e os métodos baseados na transferência dum electrão (métodos de ET) [103, 105]. Nos métodos de HAT, a actividade antioxidante numa amostra que contém o péptido é determinada pela competição entre esta amostra e uma molécula com propriedades antioxidantes pela transferência de um átomo de hidrogénio para um radical peroxilo (ROO[•]). Nos métodos de ET, à amostra com péptidos a testar para a actividade antioxidante é adicionado um oxidante que, consoante o potencial antioxidante da amostra, recebe um electrão proveniente dos péptidos da amostra e é reduzido.

As duas técnicas mais frequentemente utilizadas são o ensaio ORAC (capacidade de absorvância de radicais de oxigénio) e o ensaio TEAC (capacidade antioxidante equivalente à do Trolox[®]), as quais pertencem aos métodos de HAT e ET, respectivamente [105-107].

No ensaio ORAC é utilizado o AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)) como fonte de radicais peroxilo que irão oxidar um substrato

fluorescente, a fluoresceína, ou a amostra que contém os péptidos, com preferência pelo substrato com maior potencial antioxidante. Deste modo, consoante a extensão da oxidação do substrato fluorescente, determinada pela perda de fluorescência medida com recurso a um fluorímetro, é possível determinar a extensão da oxidação dos péptidos da amostra [106, 108].

No ensaio TEAC, também designado ensaio ABTS (2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), o radical catiónico $ABTS^{*+}$ é utilizado para oxidar os péptidos da amostra. O $ABTS^{*+}$ é um cromóforo que tem um máximo de absorvância a 734nm e quando é reduzido, por acção de um antioxidante, perde a sua cor. Através da determinação da diminuição de absorvância provocada por diferentes concentrações de péptidos a testar, é possível relacionar graficamente a variação da absorvância com a concentração de péptido. Aplicando esta análise a Trolox[®] (um antioxidante padrão) à concentração de 1mM, sabemos qual a variação de absorvância que esta condição provoca e a partir da construção gráfica obtida para a amostra, definir a actividade antioxidante em função da concentração de péptido necessária para obter um decréscimo da absorvância equivalente ao obtido com 1mM Trolox[®] (TEAC) [105-107]. Outros antioxidantes padrão podem ser utilizados, como por exemplo o ácido ascórbico, o qual tem a vantagem de ser largamente utilizado na indústria alimentar, produz resultados tão reprodutíveis como os obtidos com Trolox[®] e produz soluções finais mais estáveis que o antioxidante de referência dos métodos TEAC [109].

Nos ensaios TEAC pode também utilizar-se como oxidante e cromóforo o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) ao invés do ABTS. O princípio assenta novamente na observação da perda de cor, neste caso a reacção é monitorizada a 515nm. Outra diferença é a utilização de metanol ou etanol como solventes do oxidante, que torna este método pouco apropriado para a determinação do potencial antioxidante de proteínas pois estas tendem a precipitar nestes solventes [103, 107].

1.3.1.4. Separação e identificação dos péptidos

Geralmente, a determinação das actividades dos péptidos não é feita no leite fermentado inteiro. Estes procedimentos são por norma realizados em fracções solúveis ou fracções contendo apenas os péptidos [80, 99]. Não raras vezes os péptidos são ainda separados com recurso a separações cromatográficas e só as fracções daí obtidas é que são testadas [82, 85].

A técnica principal para fazer identificação de péptidos é a espectrometria de massa (MS), mas para obter resultados através desta técnica é preciso reduzir a complexidade da matriz do leite fermentado a uma fracção que contenha apenas os péptidos. Tendo em conta a complexidade de uma fracção que contém todos os péptidos obtidos, é vantajoso proceder à separação destes péptidos [110].

Com o objectivo de reduzir a complexidade da matriz e atendendo às propriedades dos péptidos com actividade biológica, solúveis em água e com 2-20 resíduos, é prática comum preparar um extracto solúvel a partir do leite fermentado e de seguida fraccionar esse extracto de acordo com pesos moleculares para obter uma fracção que contenha apenas os compostos solúveis em água com peso molecular inferior a 3kDa [85, 99, 111-115]. O extracto solúvel pode ser preparado por extracção com água [111-114, 116-117] ou através da sedimentação da fracção não solúvel com recurso a centrifugação [80-81, 85, 99]. O fraccionamento com base no tamanho é feito através de membranas selectivas para determinado peso molecular. Estas membranas têm poros capazes de reter as moléculas com tamanho superior e deixar passar as moléculas menores, quando uma força directriz é aplicada, por exemplo uma força centrífuga [115].

Após os fraccionamentos iniciais para obtenção da fracção peptídica, esta fracção é frequentemente separada através de processos cromatográficos, nomeadamente por cromatografia líquida de alta performance com uma coluna de fase reversa (RP-HPLC). As fracções obtidas por estes processos de separação com base no tamanho e/ou na polaridade dos diferentes componentes da amostra são posteriormente analisadas por MS [110, 118]. Muitas vezes é nestas fracções que são testados os péptidos para as actividades biológicas em estudo, havendo só análise por MS para as fracções com resultados significativos [82, 85].

As fracções obtidas podem ser directamente analisadas por MS, mas de modo a obter uma melhor separação e também para evitar sobreposições de sinais nos espectros de MS, normalmente acopla-se um fraccionamento por HPLC à análise [119].

A análise por MS com o objectivo de identificar péptidos é feita por espectrometria de massa *tandem* (MS/MS). Um sistema de análise por MS é composto por três unidades: um ionizador, que permite que as amostras adquiram carga, i.e., sejam ionizadas; um analisador, o qual analisa e separa os iões produzidos consoante a

sua razão massa/carga (m/z); e um detector, o qual permite detectar os iões com diferentes m/z e a sua abundância relativa. Com este sistema, obtém-se um espectro MS onde é possível observar os picos correspondentes aos vários péptidos da amostra. Num sistema de MS/MS, a amostra é ionizada no ionizador e de seguida é analisada num primeiro analisador que selecciona o ião com m/z correspondente ao péptido cuja estrutura primária pretendemos sequenciar; de seguida esse ião é fragmentado numa câmara de colisões, que fragmenta as ligações peptídicas, e posteriormente os fragmentos, péptidos menores e/ou resíduos de aminoácidos, são analisados num segundo analisador e detectados no detector [120-121].

As fontes de ionização mais frequentes na análise de péptidos são a ionização por electrospray (ESI) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). As sequências analisador-câmara de colisão-analisador mais utilizadas nestes estudos são dois quadropólos (Q) em série, um deles como célula de colisão (q), e um terceiro analisador por tempo de voo (TOF), representado por QqTOF ou uma trapa de iões, a qual tem a capacidade de alternar a função entre analisador e célula de colisões [81, 85, 118, 120-121].

Após aquisição dos espectros de MS/MS, estes são analisados e através da identificação dos fragmentos determina-se a sequência primária do péptido analisado [120, 122].

1.3.2. Péptidos bioactivos identificados

De entre os estudos já realizados relativos à produção de péptidos por microrganismos, a estirpe que recebeu mais atenção foi a *Lactobacillus helveticus* e foi também a partir desta estirpe que foram obtidos os péptidos bioactivos melhor conhecidos, mais documentados e já em fase de comercialização sob a forma de leites fermentados [74]. Estes são dois tripéptidos de sequência Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro com actividade anti-hipertensiva. Os péptidos com actividade anti-hipertensiva têm sido os mais estudados de entre todos os péptidos derivados do leite [14].

De uma forma geral, pode atribuir-se a determinadas actividades uma proteína precursora, sendo que geralmente os péptidos com actividade anti-hipertensiva resultam da hidrólise de caseínas e os péptidos com actividade antibacteriana tem a sua origem na degradação da lactoferrina [123-124]. Mas, considerando o que já foi dito sobre as

proteínas do leite, em particular as caseínas, e sobre as proteases bacterianas, pode concluir-se que a existências de variantes genéticas das proteínas dentro da mesma espécie e a falta de informação sobre a diversidade das proteases bacterianas, leva a que seja muito difícil poder prever a produção de péptidos para casos específicos a partir de resultados obtidos com diferentes estirpes, diferentes matrizes e diferentes origens do leite [2, 34, 78].

Na Tabela 8 encontra-se resumido os péptidos bioactivos documentados em leites fermentados, em leites de diferentes origens e para diversas estirpes, algumas delas não estudadas neste trabalho, e com indicação da respectiva actividade e fragmento. Na maioria dos estudos referenciados nesta secção, embora tenha sido feita a identificação de péptidos com recurso a MS, para as fracções com actividade foram sequenciados mais do que um péptido, não sendo assim possível a atribuição daquela actividade a uma dada sequência, e por isso esses péptidos não foram sintetizados na Tabela 8.

Analisando, com foco neste trabalho, os resultados já publicados em estudos semelhantes pode observar-se que as estirpes em estudo raramente são utilizadas, ou se o são, elas são usadas a par com outras estirpes. Deste modo, não dispondo de identificações de péptidos produzidos através da fermentação de leites com as estirpes em estudo, torna-se impossível fazer uma comparação entre a sequência primária de origem do péptido com as nossas sequências alvo (péptidos presentes nos leites em estudo) e tentar prever a possibilidade de obtenção desses péptidos. Por outro lado, a falta de dados para construir tais previsões deixa antever uma lacuna de informação que este estudo tem potencial para preencher. E esta falta de informação torna este estudo muito mais relevante, pois apresenta-se como um trabalho inovador, não só ao nível da avaliação dos leites dos pequenos ruminantes, como também ao nível do leite com a origem mais comum para o desenvolvimento de estudos sobre produtos lácteos.

Contudo, é possível encontrar alguns estudos que documentam a presença de actividade anti-hipertensiva em leites de cabra, de vaca e ovelha fermentados com *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* [52, 78, 81, 113]. Através destes resultados é possível prever algum potencial nestas combinações, contudo ao sintetizar os resultados conseguidos nos dois estudos citados não foram tidos em conta factores como as variantes genéticas.

Tabela 8 – Resumo dos péptidos documentados para leites fermentados.

Actividade biológica	Proteína precursora	Origem do leite	Estirpe fermentadora	Fragmento	Ref.
Anti-hipertensiva	β -caseína	búfala	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	f(126-130)	[125]
Anti-hipertensiva	α_{s1} -caseína	vaca	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>Lactococcus</i> ssp. <i>cremoris</i>	f(1-9)	[80]
Anti-hipertensiva	β -caseína	vaca	<i>Lactobacillus helveticus</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	f(74-76), f(84-86)	[79]
Anti-hipertensiva	β -caseína	vaca	<i>Enterococcus faecalis</i>	f(58-76), f(133-138)	[85]
Anti-hipertensiva	β -caseína	vaca	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> + <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	f(6-14), f(7-14), f(47-52), f(73-82), f(74-82), f(75-82), f(169-175)	[126]
Anti-hipertensiva	β -caseína	vaca	<i>Lactobacillus jensenii</i>	f(11-26), f(11-20)	[81]
Anti-hipertensiva	β -caseína	vaca	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>Lactococcus</i> ssp. <i>cremoris</i>	f(47-52), f(176-182)	[80]
Anti-hipertensiva	κ -caseína	vaca	<i>Lactobacillus helveticus</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	f(108-110)	[79]

Por fim, é importante ressaltar que a determinação da actividade *in vitro* do potencial dos péptidos bioactivos e sua identificação, embora seja uma boa forma de seleccionar os péptidos com potencial, não pode ser directamente entendida como a garantia da existência dessa actividade *in vivo* [102-103]. No sentido de confirmar a actividade *in vivo*, após a identificação dum péptido deverão ser realizados mais estudos que utilizem modelos que permitam garantir que a actividade determinada *in vitro* se mantém e avaliar a biodisponibilidade e possíveis efeitos adversos do péptido bioactivo.

2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

Os leites fermentados têm vindo a ser alvo de inúmeros estudos no sentido de conhecer melhor a sua matriz e avaliar as suas potencialidades ao nível da saúde humana. A utilização de novas culturas de arranque tem sido um campo largamente explorado com a introdução de probióticos no processo de produção destes lacticínios, contudo o principal foco destes estudos tem sido a obtenção de péptidos com actividade biológica. A este interesse pela obtenção de novos produtos com impacto positivo na saúde, junta-se o facto de leites de diferentes origens apresentarem diferente composição, o que tem impacto não só ao nível nutricional, mas também ao nível socioeconómico. Estas diferenças evidenciam a necessidade e o interesse de adquirir mais informação sobre estes leites e sobre os seus derivados, procurando valorizá-los ao nível do mercado emergente dos alimentos funcionais.

No sentido de estudar os leites fermentados com estirpes probióticas na produção de péptidos bioactivos existe já uma linha experimental definida a qual compreende 3 fases fundamentais: obtenção dos leites fermentados, avaliação do potencial bioactivo dos péptidos destes leites e a sua identificação.

O presente trabalho teve como objectivo geral estudar as actividades anti-hipertensiva e antioxidante dos péptidos formados em leites de cabra, ovelha e vaca fermentados com bactérias probióticas das estirpes *Bifidobacterium animalis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus casei-01* e *Lactobacillus paracasei* LAFTI® L26.

Os objectivos específicos deste trabalho foram:

- ▶ Estudar o efeito dos leites de diferentes origens (vaca, cabra e ovelha) e do armazenamento sobre o crescimento e sobrevivência de bactérias probióticas (*B. animalis* Bb-12, *L. acidophilus* La-5, *L. casei-01* e *L. paracasei* LAFTI® L26.) em leites fermentados simbióticos por adição de inulina;
- ▶ Avaliar a extensão da proteólise nos leites fermentados simbióticos ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C;

- ▶ Determinar a actividade anti-hipertensiva e a actividade antioxidante dos leites fermentados simbióticos;
- ▶ Avaliar de forma exploratória a composição proteica dos leites fermentados simbióticos por espectrometria de massa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 9 está representado o fluxograma do trabalho experimental realizado com os leites fermentados nesta tese, o qual será reportado de forma detalhada neste capítulo.

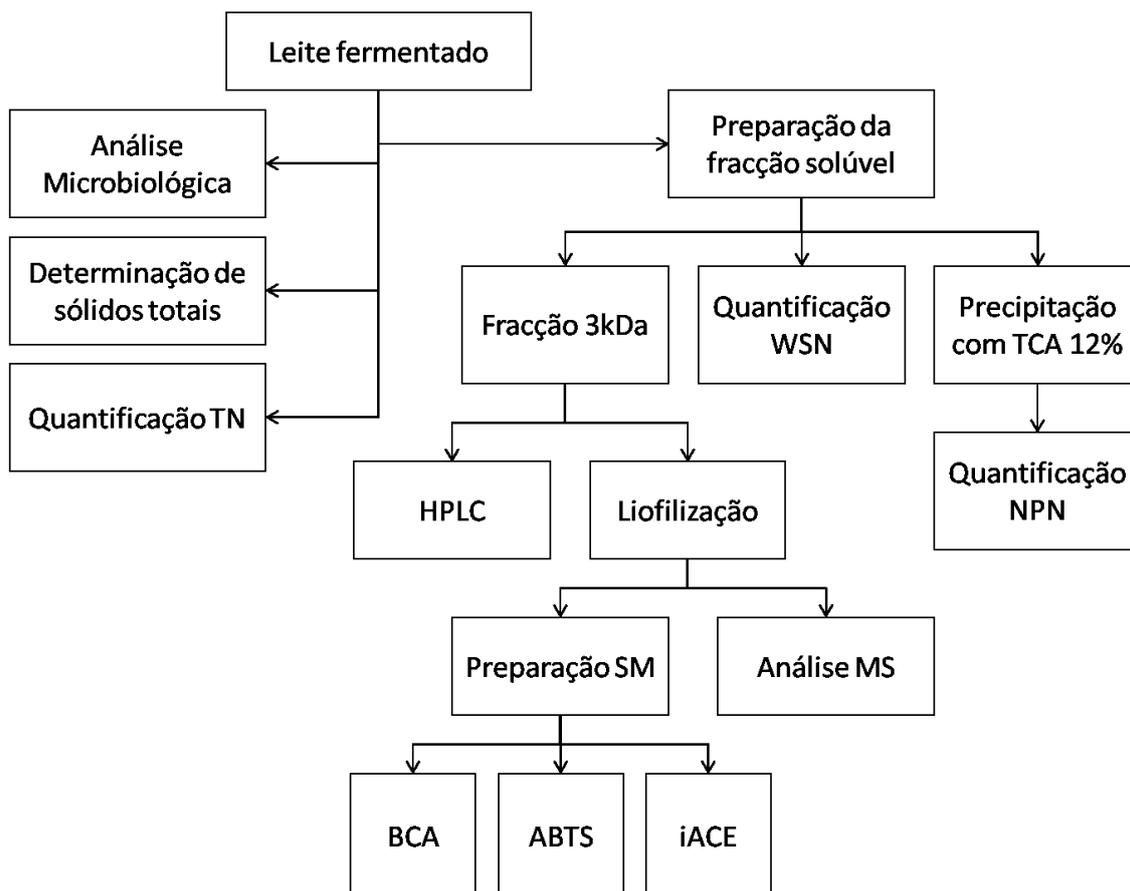


Figura 9 – Fluxograma do trabalho experimental realizado nesta tese.

3.1. PRODUÇÃO DE LEITES FERMENTADOS

Reactivação do inóculo. Os inóculos foram preparados a partir de culturas probióticas liofilizadas Nu-trish[®] *Bifidobacterium animalis* Bb-12, Nu-trish[®] *Lactobacillus acidophilus* La-5 e Nu-trish[®] *Lactobacillus casei-01* da Chr. Hansen (Dinamarca) e DELVO-PRO[®] *Lactobacillus paracasei* LAFTI[®] L26 da DSM (Austrália). Cada um dos 4 inóculos foi preparado a partir da suspensão de 1g de cultura liofilizada em 9mL de água peptonada estéril (0,1% (m/v) peptona e 0,85% (m/v) NaCl). Cada suspensão foi de seguida adicionada a 2% (v/v) em MRS broth suplementado com 0,5g/L de cisteína hidrocloreada em frascos de colo longo de 50mL.

Após inoculação cada frasco de MRS broth foi incubado a 37°C durante 24h. Após esta fase de reactivação em MRS broth, 1 mL de cada uma destas culturas foi transferido em duplicado para frascos de colo longo de 50mL com skim milk suplementado com 0,5g/L de cisteína hidrociorada, que foram depois incubados a 37°C durante 24h, juntamente com 2 frascos com skim milk e sem inoculo. Todos os reagentes utilizados eram de qualidade microbiológica, sendo o MRS broth obtido da Scharlau (Espanha), o skim milk da Merck (Alemanha), a peptona da HIMEDIA (Índia) e a cisteína hidrociorada da Panreac (Espanha)

Tratamento térmico do leite. O leite cru foi recolhido junto dos produtores e proveio de vacas da raça Holstein Frísia (distrito de Viseu), ovelhas da raça Serra da Estrela e cabras das raças Alpina e Saanen (ANCOSE, Serra da Estrela). Para cada leite foi determinado o valor de pH com recurso a um potenciómetro e de seguida cada um dos três leites foi distribuído em frascos de 500mL que foram colocados na autoclave com um sensor de temperatura no interior de um frasco. Dentro do aparelho os frascos foram sujeitos a aquecimento até aos 90°C e de seguida manteve-se a temperatura entre 90 e 95°C durante 15min. Após os 15min os frascos foram retirados da autoclave e sujeitos a arrefecimento rápido até à temperatura de 40-50°C.

Inoculação do leite. Para cada leite, dez frascos de leite termizado foram suplementados com 10g de inulina estéril e 0,25g de cisteína hidrociorada estéril. Em pares, 8 destes frascos foram inoculados com 5% (v/v) de cada uma das 4 estirpes probióticas crescidas em skim milk como descrito na reactivação do inoculo (Figura 10). Os restantes 2 frascos foram inoculados com 5% (v/v) de skim milk sem inóculo e acidificados com um volume de ácido láctico (estéril) a 20% (v/v) previamente estimado para abaixar o pH até 4,5, num frasco extra de leite termizado. O ácido láctico foi obtido na HIMEDIA, a cisteína proveio da Panreac e a inulina era Orafti® Inulin oferecida pelo grupo Beneo-Orafti (Bélgica).

Fermentação. Cada leite inoculado foi distribuído em 5 frascos estéreis de 100mL que foram de seguida incubados em estufa a 44°C por um período mínimo de 12h. Ao fim de 12h, os leites sem estirpes e com acidificação por acção do ácido láctico foram retirados da estufa, controlou-se o pH num dos frascos de cada lote, outro frasco de cada lote foi utilizado para fazer a análise do leite fermentados aos zero dias e os restantes frascos dos dois lotes foram armazenados. Para os restantes leites inoculados,

utilizou-se um frasco de cada lote para controlar o pH de hora a hora após as 12h de fermentação. Os lotes foram retirados da estufa à medida que se determinaram valores de pH de aproximadamente 4,5 ou até a um máximo de 18h de fermentação. Após o término da fermentação, um frasco por lote foi utilizado para fazer a análise do leite fermentado ao tempo 0 dias e os restantes frascos foram armazenados.

Armazenamento. Os leites fermentados, frascos de 100mL de leites inoculados após a fermentação, foram armazenados em frigorífico a 4°C durante um período máximo de 28 dias.

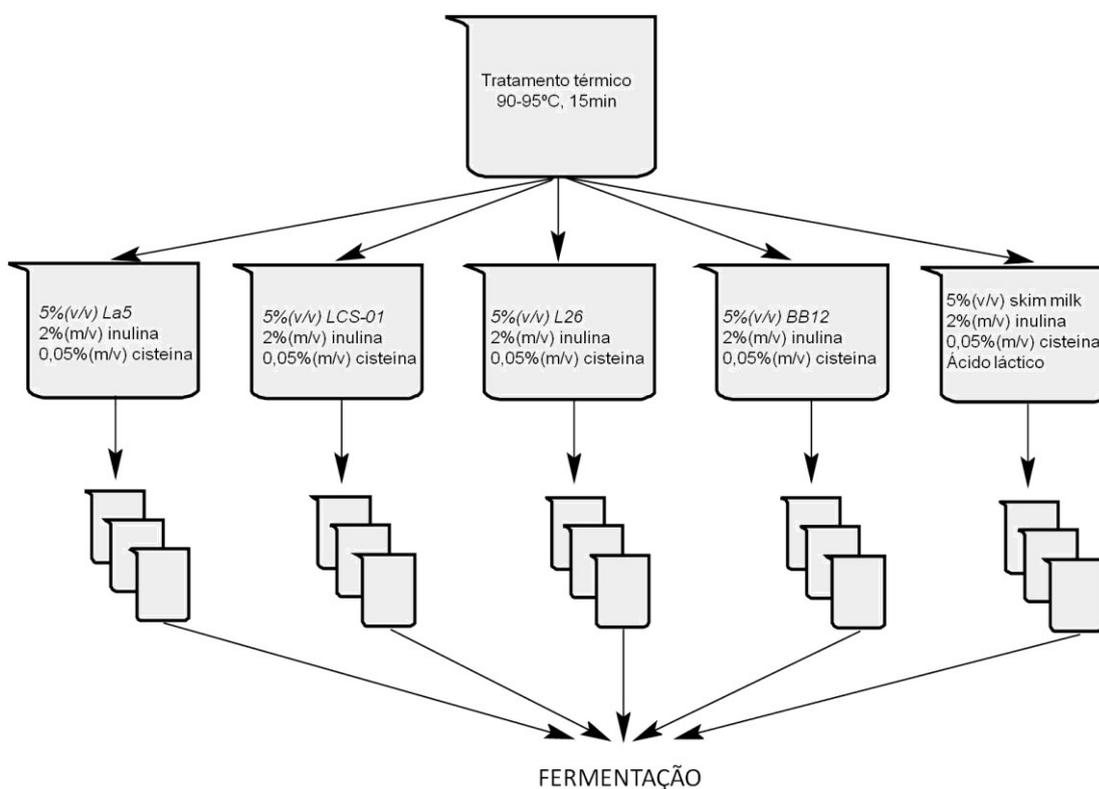


Figura 10 – Representação esquemática do procedimento experimental da produção dos leites fermentados. Cada 1 dos 5 lotes de leite inoculado representados no esquema foi preparado em duplicado. Os inóculos designados na figura por La5, LCS-01, L26 e BB12 correspondem respectivamente às estirpes *L. acidophilus* La-5, *L. casei*-01, *L. paracasei* LAFTI® L26 e *B. animalis* Bb-12.

3.2. ANÁLISE DOS LEITES FERMENTADOS

Análise microbiológica. O número de células viáveis de cada estirpe bacteriana em cada leite fermentado foi determinado em placas de meio de cultura MRS agar. Para avaliar a presença de possíveis contaminações no leite termizado foi utilizado o meio de

cultura PCA (plate count agar); foi retirado 1mL a cada um de 4 frascos de leite termizado escolhidos de forma aleatória, realizadas sucessivas diluições decimais em água peptonada e estas foram subsequentemente plaqueadas, em duplicado, em placas de petri com PCA divididas ao meio, tendo-se inoculado o volume de 50 μ L em cada metade da placa.

O número de células viáveis nos leites inoculados com estirpe antes da fermentação foi monitorizado efectuando diluições decimais em água peptonada que foram plaqueadas (50 μ L em cada metade da placa) em placas de petri contendo MRS agar.

Os leites fermentados foram analisados após o término da fermentação, considerado o dia 0 de armazenamento, e ao fim de 14 e 28 dias de armazenamento. Em cada ponto de amostragem os leites fermentados foram monitorizados em termos de número de células viáveis e possível contaminação. Estas análises foram realizadas como já descrito para os leites termizados e os leites inoculados com estirpe antes da fermentação, com pequenas variações ao nível da preparação da primeira diluição decimal. No caso dos leites fermentados a primeira diluição decimal foi preparada a partir da pesagem, em ambiente estéril, de 4 g de cada um dos leites fermentados a amostrar e adição de solução de citrato de sódio estéril a 2% (m/v) até perfazer a massa de 40g. De seguida a amostra com citrato de sódio foi homogeneizada num Stomacher[®] 400 circulator da Seward (Reino Unido) durante 3 minutos a 230rpm e a partir deste homogeneizado foram preparadas diluições decimais em água peptonada estéril e inoculadas em placas de PCA e MRS agar como já descrito anteriormente.

Todas as placas de PCA e MRS agar foram incubadas em estufa a 37°C durante 48h em condições de aerobiose, excepto nos casos das placas de MRS agar correspondentes aos leites com as estirpes *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12. Esta incubação foi feita em condições de anaerobiose em jarras contendo um redutor de oxigénio Anaerocult[®] A e um indicador Anaerotest[®] ambos da Merck (Alemanha). Após as 48h de incubação, foi verificado a presença/ausência de crescimento nas placas de PCA e contou-se o número de unidades formadoras de colónias (CFU) nas placas de MRS agar, utilizando-se para tal a diluição com mais de 15 e menos de 150 CFU's em cada metade da placa.

Os reagentes utilizados eram de qualidade microbiológica e o PCA e o MRS agar provieram da Merck (Alemanha), o citrato de sódio da Fisher Scientific (Reino Unido). O meio de MRS agar utilizado nas placas para determinação do número de células viáveis foi suplementado com 0,5g/L de cisteína hidrocloreada, a qual foi obtida na Panreac (Espanha).

Análise físico-química. O pH foi determinado para o leite cru, os leites inoculados e os leites fermentados durante a fermentação e em cada ponto de amostragem. A medição do pH foi efectuada com um potenciómetro GLP21 da Crison (Espanha). A determinação da percentagem de sólidos totais foi realizada para os leites fermentados em cada ponto de amostragem pelo método gravimétrico. Para cada amostra foram utilizadas duas alíquotas de aproximadamente 3g que foram pesadas em balança analítica e secadas em estufa a 105°C durante 5h; após este período foram pesadas novamente e voltaram à estufa durante mais 2h sendo pesadas de novo no fim desse tempo. Se a diferença entre a percentagem de humidade determinada após 5h de secagem e 5+2h de secagem fosse de 0,05% ou inferior, a percentagem de sólidos totais era obtida pela diferença entre a percentagem de humidade e 100%. No caso de as percentagens de humidade determinadas após 5h e 5+2h de secagem em estufa divergirem entre si mais de 0,05%, continua-se com ciclos de 2h de secagem até peso constante e variação inferior a 0,05%.

3.3. PREPARAÇÃO DA FRACÇÃO SOLÚVEL

A fracção solúvel foi preparada segundo Kuchroo e Fox [116-117], tendo-se pesado o leite fermentado e adicionado o dobro da massa em água desionizada. A mistura foi homogeneizada durante 5min no Stomacher[®] 400 circulator (Seward, Reino Unido) a 230rpm. De seguida o homogeneizado foi mantido em banho a 40°C durante uma hora e depois filtrado com filtro nº 1 da Whatman (Reino Unido). O filtrado, que corresponde á fracção solúvel, foi de seguida devidamente acondicionado (-20°C) para posteriormente se quantificar teores de azoto e para avaliar as actividades biológicas dos leites fermentados.

A metodologia descrita para a preparação da fracção solúvel foi aplicada a todos os leites fermentados preparados, contudo os leites fermentados com a estirpe probiótica

B. animalis Bb-12 sofreram um abaixamento de pH até 4,5 provocado pela adição controlada, por potenciómetro, de HCl 1,41M.

3.4. DETERMINAÇÃO DA EXTENSÃO DA PROTEÓLISE

Para determinar a extensão da proteólise nos leites fermentados recorreu-se ao método de Kjeldahl [127] para quantificar o azoto das fracções de azoto total (do inglês *total nitrogen*, TN), azoto solúvel (do inglês *water soluble nitrogen*, WSN) e azoto não proteico (do inglês *nonprotein nitrogen*, NPN). Neste trabalho, por questões logísticas, foram utilizadas duas metodologias de kjeldahl, macro- e micro-kjeldahl. Para garantir a possibilidade de comparação dos resultados obtidos em cada um dos métodos, duas amostras aleatórias foram quantificadas pelos dois métodos e os resultados comparados, garantindo-se um erro entre os dois métodos de 2 a 6%, o que é inferior ao erro máximo aceite entre determinações da mesma amostra com o mesmo método que é de 10%.

Fracção de azoto total (TN). A fracção TN foi quantificada directamente a partir duma porção de amostra recolhida dos frascos de leite fermentado. A porção utilizada foi 5g nas análises por macro-kjeldahl e 0,5g nas análises por micro-kjeldahl.

Fracção de azoto solúvel (WSN). A fracção WSN foi quantificada directamente a partir de alíquotas das fracções solúveis preparada. O volume das alíquotas pesadas diferiu entre as duas metodologias utilizadas, tendo sido de 5mL nas análises realizadas por macro-kjeldahl e 2mL nas análises por micro-kjeldahl.

Fracção de azoto não proteico (NPN). A fracção NPN foi quantificada a partir da fracção solúvel após precipitação desta com ácido tricloroacético (TCA) proveniente da Panreac (Espanha). A uma alíquota pesada de 22,5mL de fracção solúvel adicionou-se 7,5mL pesados duma solução de TCA (ácido tricloroacético) a 48% (m/v) para obter uma concentração final de TCA de 12%, que promove a precipitação das proteínas. Esta mistura foi agitada e de seguida deixada em repouso durante 30min à temperatura ambiente, sendo por fim filtrada com filtro nº 42 da Whatman (Reino Unido) e o filtrado recolhido utilizado para quantificar a fracção NPN. Para a quantificação desta fracção utilizou-se 5mL de filtrado em cada análise, independentemente do método utilizado.

Macro-kjeldhal. Para cada uma das 3 fracções foram preparados tubos de kjeldahl em duplicado contendo em cada tubo 5g ou 5mL pesados de amostra a

quantificar, 2 pastilhas de 3,5g com 99,9% de K_2SO_4 e 0,01% de selênio da Panreac (Espanha), 7mL de H_2SO_4 a 98%, 5mL de H_2O_2 e pedacinhos de porcelana porosa. Os tubos preparados foram digeridos num digestor UDK 130D (Velp Scientifica, Itália) por 30min a 420°C e seguidamente destilados num destilador UDK 130D (Velp Scientifica, Itália) usando 50mL de água ultrapura e 50mL de NaOH a 35%, durante 2min e 50s. O produto da destilação foi recolhido em 25mL duma solução de ácido bórico a 4% (m/v). Ao destilado foram de seguida adicionadas 10 gotas de indicador Tashiro e titulou-se com HCl padronizado. As soluções de HCl de aproximadamente 0,025M, 0,05M, 0,1M e 0,2M foram preparadas a partir de HCl concentrado (37% (v/v)) e padronizadas com soluções de Na_2CO_3 anidro preparadas por dissolução de aproximadamente 0,0250g, 0,0500g, 0,1000g e 0,2000g, pesadas em balança analítica, em 25mL de água ultrapura. Estas soluções de Na_2CO_3 foram depois tituladas pelo respectivo ácido a padronizar, na presença do indicador alaranjado de metilo. O indicador de Tashiro utilizado na titulação da amostra cujo azoto se pretendia quantificar foi preparado através da mistura de duas soluções: vermelho de metilo a 0,012% (m/v) em álcool etílico a 95% e azul de metileno a 0,002% (m/v) em água destilada.

Micro-kjeldahl. Prepararam-se tubos de kjeldahl com aproximadamente 1g de catalisador em pó, preparado a partir da maceração de pastilhas de catalisador da FOSS com a composição 3,5g de K_2SO_4 e 0,4g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Aos tubos com catalisador adicionou-se a amostra a quantificar cuja quantidade pesada dependeu da fracção a analisar. Para a fracção TN pesou-se 0,5g de amostra, para a fracção WSN foram pesados 2mL e para a fracção NPN pesaram-se 5mL. Aos tubos com catalisador e amostra adicionou-se 4mL de H_2SO_4 e digeriu-se no digestor Kjeltex System 2012 (Tecator, Suécia) durante 30min a 420°C ou até obter cor verde vivo. Concluída a digestão, iniciou-se a destilação com a adição de 20mL de água destilada a cada tubo que foi depois destilado no destilador Kjeltex System 1002 Distilling Unit (Tecator, Suécia). O destilado foi recolhido em 25mL de ácido bórico a 4% (m/v) com indicador vermelho de metilo/bromocresol (cada litro de ácido bórico continha 10mL de verde de bromocresol a 1% (m/v) e 7mL de vermelho de metilo a 1% (m/v), ambos preparados em álcool etílico) e titulado com as soluções de HCl descritas para o macro-kjeldahl.

Cálculo da quantidade de azoto. A partir dos volumes de HCl gastos na titulação determinou-se estequiometricamente a massa de azoto presente na amostra. Os valores de azoto encontrados foram depois normalizados para a massa de sólidos

presentes na amostra pesada, tendo-se em consideração os factores de diluição nas amostras que incluíram fraccionamento. Deste modo, para cada fracção quantificada obteve-se um valor de massa de azoto por massa de amostra. Esta quantificação nas fracções WSN e NPN foi relativizada para a fracção de azoto total da amostra, obtendo-se uma quantificação de percentagem de azoto nas fracções WSN e NPN em função do teor total determinado na fracção TN.

3.5. AVALIAÇÃO DAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DOS LEITES FERMENTADOS

Fraccionamento por tamanho. As fracções solúveis obtidas para os tempos 0 e 28 dias e a fracção solúvel dos 14 dias da primeira réplica biológica do leite de vaca fermentado com *Lactobacillus casei* foram fraccionadas por tamanho, utilizando-se para isso filtros Amicon[®] Ultra da Millipore (EUA). Primeiramente 45mL de fracção solúvel foram filtrados por filtros Amicon[®] Ultra com capacidade para 15mL e membrana selectiva para o peso molecular de 10kDa que foram centrifugados durante 90min a 6000rpm na centrífuga Universal 320R (Hettich, Alemanha). De seguida, a fracção com peso molecular menor que 10kDa obtida foi filtrada por filtros Amicon[®] Ultra com capacidade para 15mL e membrana selectiva para o peso molecular de 3kDa que foram centrifugados durante 45min a 6000rpm na centrífuga Universal 320R (Hettich, Alemanha). Desta separação por tamanho resultaram 3 fracções: a fracção com peso molecular inferior a 3kDa ($PM < 3kDa$), a fracção com peso molecular compreendido entre 3 e 10kDa ($3kDa < PM < 10kDa$) e a fracção com peso molecular superior a 10kDa ($PM > 10kDa$). Para cada fracção solúvel que foi fraccionada, dos 45mL iniciais, resultaram aproximadamente 30mL de fracção com $PM < 3kDa$, 10mL de fracção com $3kDa < PM < 10kDa$ e 3mL de fracção com $PM > 10kDa$. A fracção com $PM > 10kDa$ foi armazenada a $-20^{\circ}C$, enquanto as fracções com $PM < 3kDa$ e $3kDa < PM < 10kDa$ foram liofilizadas.

Preparação de ressuspensões e quantificação de proteína. Os liofilizados das fracções com $PM < 3kDa$ foram ressuspensos (50mg liofilizado/1 mL água ultrapura) e a solução obtida foi utilizada para proceder à determinação das actividades biológicas dos leites fermentados. A quantificação de proteína foi realizada pelo método do ácido bicinónico (BCA) com o kit comercial Pierce BCA Protein Assay da Thermo Scientific (EUA). Foram seguidas as instruções do kit para a quantificação tendo sido utilizado 50 μ L da solução de proteína a quantificar e a absorvância a 562nm lida no

espectrofotómetro UVmini 1240 da Shimadzu (Japão), utilizando como branco o reagente de trabalho sem solução a quantificar igualmente incubado a 37°C por 30min. A quantidade de proteína presente nas amostras foi estimada com recta de calibração produzida por medição da absorvância a 562nm de soluções-padrão de BSA (albumina do soro bovino) incluídas no kit e quantificadas com o mesmo reagente de trabalho utilizado para as amostras. A proteína das amostras foi quantificada a partir da ressuspensão de liofilizado diluída 32 vezes. Esta diluição foi obtida por diluições consecutivas de 2 vezes a partir da solução preparada pela ressuspensão dos liofilizados, diluições estas que foram também utilizadas para determinar as actividades anti-hipertensiva e antioxidante.

Determinação da actividade anti-hipertensiva. A actividade anti-hipertensiva foi determinada pelo método descrito por Sentandreu. & Toldrá [97] e foi realizado em microplaca de poliestireno preta da Nunc (Dinamarca). Em cada microplaca foram analisadas 3 amostras e na montagem da placa foram preparadas leituras de fluorescência para controlo negativo, controlo positivo, controlo negativo das amostras e controlo positivo amostras. O controlo negativo foi preparado só com substrato e serviu o propósito de anular a fluorescência do substrato, o controlo positivo serviu para controlar a actividade máxima da enzima na conversão do substrato e foi preparado juntando apenas enzima e substrato. O controlo negativo da amostra foi preparado com amostra e substrato e serviu a anular a fluorescência do substrato na presença da amostra, o efeito da amostra na actividade da enzima ECA foi avaliado pelo controlo positivo da amostra que foi preparado pela mistura da enzima e do substrato na presença de amostra. Para cada amostra foram preparadas leituras de controlo negativo da amostra, em duplicado, e controlo positivo da amostra, em triplicado, para a solução obtida da ressuspensão a partir do liofilizado e para as 5 primeiras diluições preparadas a partir de diluições consecutivas de 2 vezes a partir da ressuspensão do liofilizado (diluições: 1x, 2x, 4x, 8x, 16x e 32x). Também o controlo negativo e o controlo positivo foram preparados em duplicado. As quantidades de reagente adicionadas por poço de microplaca em cada tipo de leitura preparada estão discriminadas na Tabela 9.

O substrato fluorescente utilizado na determinação da actividade anti-hipertensiva foi o *o*-aminobenzoilglicil-*p*-nitrofenilalanilprolina proveniente da Bachem Feinchemikalien (Suiça) que foi preparado no momento da adição à placa, imediatamente antes da adição da enzima, por dissolução de 0,0036g do substrato em

16mL de tampão de substrato por cada placa preparada. O tampão do substrato foi preparado com Tris-HCl da Fluka e NaCl da Merck de modo a obter um tampão de pH 8,3 com concentrações finais de Tris e NaCl de 150mM e 1125mM, respectivamente.

Tabela 9 – Quantidades de reagentes por poço em cada microplaca preparada para a determinação da actividade anti-hipertensiva das amostras.

Quantidade / poço	Branco	Branco amostra	Controlo	Amostra
40 µL	H ₂ O	H ₂ O	Enzima	Enzima
40 µL	H ₂ O	Amostra	H ₂ O	Amostra
160 µL	Substrato	Substrato	Substrato	Substrato

A Enzima Conversora da Angiotensina I utilizada neste estudo foi a peptidil-dipeptidase A (EC 3.4.15.1) obtida na Sigma-Aldrich (EUA) sob o código A 6778-5UN. Ao pó liofilizado adquirido juntou-se 5mL de solução de glicerol a 50% preparada em água utrapura, obtendo-se uma solução de enzima com 1U/mL que foi imediatamente dividida em aliquotas de 200µL que foram conservadas a -20°C. No momento de aplicação da enzima na placa, imediatamente antes da leitura desta, diluiu-se a 100 µL da solução armazenada de enzima em 2,4mL de tampão de enzima. O tampão de enzima foi preparado com Tris-HCl da Fluka e ZnCl₂ da Merck (Alemanha). O tampão da enzima foi obtido através da preparação duma solução de pH 8,3 com uma concentração de Tris de 150mM à qual se adicionou ZnCl₂ a 0,1mM (preparada por diluição duma solução de 1mM) de modo a obter uma concentração final de 0,1µM de ZnCl₂ no tampão da enzima.

Após a montagem da placa, esta foi introduzida no leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA da BMG Labtech (Alemanha), que realizou a incubação das soluções de leitura durante 30min a 37°C e no fim do tempo de incubação obteve medidas de emissão fluorescência a 420nm de cada poço da microplaca, após excitação a 350nm. O procedimento do fluorímetro foi controlado com o software Fluostar Control versão 1.32 R2.

Os valores de emissão fluorescência recolhidos no fluorímetro foram de seguida tratados de modo a obter a percentagem de inibição da actividade da ECA (% *Actividade IACE*) de acordo com a fórmula abaixo, onde *Fcontrolo*, *Fbranco*, *Famostra* e *Fbranco da amostra* indicam a fluorescência emitida determinada para cada um das

leituras preparadas para o “controle positivo”, “controle negativo”, “controle positivo da amostra” e “controle negativo da amostra”, respectivamente:

$$\% \text{ Actividade IACE} = \frac{(F_{\text{controle}} - F_{\text{branco}}) - (F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco da amostra}})}{F_{\text{controle}} - F_{\text{branco}}} \times 100$$

Pela relação gráfica entre o inverso da quantidade de proteína em cada diluição ($1/[proteína]$), determinada pela quantificação de proteína pelo método do BCA, e o inverso da percentagem de inibição ($1/\%inibição$) de cada diluição obtêm-se uma relação linear do tipo $(1/\%inibição) = m \cdot (1/[proteína]) + b$ a partir da qual é possível, através da relação matemática $m/(0,02-b)$, determinar a concentração de proteína necessária para inibir 50% da actividade da ECA, isto é, o IC₅₀ da amostra.

Inicialmente foram testados alguns leites fermentados de forma aleatória. Os leites fermentados nesta fase foram réplicas aleatórias dos leites de ovelha fermentados com *L. casei-01* com 0 e com 28 dias de armazenamento, ainda nos leites de ovelha testaram-se leites com 28 dias de armazenamento fermentados com *L. paracasei* LAFTI® L26 e controle. Dos leites de cabra testaram-se réplicas aleatórias de leite fermentado controle com 0 dias de armazenamento e leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI® L26 com 28 dias de armazenamento. Dos leites de vaca foi testada uma das réplicas de leite fermentado com *L. casei-01* com 28 dias de armazenamento.

Determinação da actividade antioxidante. Preparou-se uma solução concentrada de ABTS^{•+} através da mistura de uma solução de ABTS a 7mM com uma solução de persulfato de potássio a 2,45mM, na proporção 1:1 (v/v). Esta solução foi deixada durante a noite, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente para que o persulfato de potássio induzisse a radicalização do ABTS. Após este tempo, a solução concentrada de ABTS^{•+} foi conservada ao abrigo da luz em frigorífico. A solução de ABTS^{•+} concentrada preparada foi diluída de modo a obter uma leitura de absorvância a 734nm entre 0,680 e 0,720. A actividade foi determinada por ensaios espectrofotométricos que consistiram na adição de um volume de amostra entre 10 e 60µL a 1mL de solução de ABTS^{•+} diluída, agitação da mistura e leitura da absorvância a 734nm exactamente 6min após a adição da amostra. Cada ensaio foi feito em triplicado e o volume de amostra foi adequado à resposta obtida de modo a que o valor de absorvância da amostra fosse 20 a 80% da absorvância inicial. Normalmente utilizou-se 40µL de

amostra, contudo em casos pontuais os volumes de amostra foram de 20 ou 60 μ L. Os valores de actividade antioxidante são dados em equivalentes de ácido ascórbico, valor que é calculado com recurso a curvas padrão construídas por determinação da absorvância a 734nm do ABTS^{•+} na presença de concentrações diferentes mas conhecidas de ácido ascórbico. Para cada volume de amostra utilizado foi construída uma curva de calibração com ácido ascórbico adicionando os padrões no mesmo volume em que a amostra foi adicionada. O persulfato de potássio proveio da Merck., o ABTS foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA) bem como o ácido ascórbico, este último com um grau de pureza de 99,0%.

3.6. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.

Obtenção do perfil de HPLC das amostras. O perfil de HPLC foi obtido para as amostras que foram alvo de análise por espectrometria de massa e foram obtidos a partir de uma porção da fracção com PM < 3kDa antes desta ser liofilizada (Figura 10). As amostras injectadas no HPLC foram previamente filtradas com filtros tipo GPWP com porosidade de 0,22 μ m da Millipore (EUA). As fases móveis utilizadas foram também previamente filtradas com filtros tipo HAWP com porosidade de 0,45 μ m da Millipore (EUA) e posteriormente desgaseificadas antes de serem utilizadas na corrida das amostras. Para cada amostra foram adquiridos perfis de HPLC em duplicado, tendo-se utilizado aparelhos SYSTEM GOLD[®] da Beckman Coulter (EUA) nestas aquisições. Acoplado a este sistema utilizou-se uma coluna Cosmosil C18 4.6ID x 250mm (Nacalai, EUA) à temperatura de 37°C na qual um dispensador automático de amostras (508 Autosampler das Beckman Coulter, EUA) injectou 50 μ L de amostra, que foi eluido com um fluxo de 0,3mL/min produzido pelo injector de solventes 126 Solvent Module (Beckman Coulter, EUA). As fases móveis utilizadas foram: fase A, composta por 0,01% (v/v) TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura, e a fase B, composta por 0.008% (v/v) TFA em acetonitrilo. O programa da corrida de HPLC teve a duração de 80min, tendo sido iniciado com 90% do eluente A durante 5min, taxa que foi diminuída de forma linear durante 25min até aos 60% e decresceu novamente de forma linear até aos 10% de eluente A durante os 5min seguintes. Aos 35min da corrida a taxa de eluente A manteve-se nos 10% durante 5 min, começando de seguida a aumentar até aos 90% durante 5min e manteve-se nesta taxa até à conclusão da corrida. A corrida de HPLC foi programada e gerida a partir do software 32 Karat[™] (Beckman Coulter,

EUA). Os péptidos eluídos foram detectados recorrendo a detector UV 168 Detector (Beckman Coulter, EUA) que fez medições de absorvância na gama de UV entre os 168 e os 280nm.

Análise por HPLC-MS. Para realizar a análise por espectrometria de massa utilizaram-se porções de liofilizado das amostras com aproximadamente 1mg de proteína. As amostras sujeitas à análise por HPLC-MS foram leites fermentados com 0 dias de armazenamento. De entre estes analisaram-se as réplicas 1 dos controlos (leite fermentado sem estirpe) dos leites de vaca, cabra e ovelha e as réplicas 2 dos leites fermentados com estirpe *L. paracasei* LAFTI[®] L26 para os 3 tipos de leite e com as estirpes *L. casei-01* e *B. animalis* Bb-12 apenas para o leite de ovelha. Todos os liofilizados com ~1mg de proteína foram ressuspensos em 400µL de água ultrapura com 2% de acetonitrilo, com excepção dos controlos de vaca e cabra que precisaram dum total de 600µL de solvente para se conseguir a dissolução completa do liofilizado. A ressuspensão obtida foi filtrada com filtros de seringa Spartan[®] com uma membrana de Teflon[®] com 0,45µm de porosidade da Whatman (Reino Unido) e 10µL do filtrado foram injectados na coluna Discovery[®] Bio Wide Pore C18 (15cm x 0,5mm, tamanho das partículas de 5µm) obtida da Supelco (EUA). A coluna encontrava-se acoplada a um sistema de HPLC Waters 2690 (EUA), o qual produz um fluxo de eluição mínimo de 300µL/min e por isso foi necessário introduzir um “splitter” entre as bombas do HPLC e o injector de modo a conseguir um caudal de 10µL/min. As amostras foram eluídas com duas fases móveis, a fase A, 2% de acetonitrilo e 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura, e a fase B, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo. A eluição da amostra teve a duração de 60min, que foram iniciados com 100% de eluente A durante 5min, tendo esta taxa decrescido durante 30min até aos 20% de eluente A, que foram atingidos aos 35min de eluição, quando começou um aumento da taxa de eluente A até aos 100% durante 15min, taxa que foi mantida durante os últimos 10min da corrida.

O sistema de HPLC foi acoplado a sistema de análise de espectrometria de massa (MS) e espectrometria de massa tandem (MS/MS) da ThermoFinnigan (EUA), um Linear Ion trap LXQ (LIT), composto por uma fonte de ionização de electrospray (ESI) e uma trapa de iões como analisador. De forma a aumentar a sensibilidade do sistema, foi adicionado um caudal pós-coluna de 4µL/min de metanol, de forma a facilitar a vaporização da amostra. A fonte de electrospray operou à voltagem de 5kV,

com uma temperatura do capilar de transferência de 350°C e um caudal do gás auxiliar de 25 unidades (unidades arbitrárias). Nas experiências de espectrometria de massa tandem utilizou-se uma energia de colisão de 20 unidades (unidades arbitrárias). A aquisição e tratamento de dados foram realizados com o software ThermoFinnigan Xcalibur V2.0 (EUA).

3.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.

O tratamento estatístico foi feito com recurso ao software SPSS v19 (EUA) e fez-se análise da variância a um factor (One-way ANOVA) para determinar a influência das variáveis em estudo tipo de leite, estirpe fermentadora e tempo de armazenamento, nos resultados obtidos. O teste de Tukey, com nível de significância de 5%, foi aplicado aos resultados experimentais tendo em conta cada estirpe utilizada no trabalho de modo a determinar as diferenças estatisticamente significantes entre todos os pares possíveis.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS LEITES FERMENTADOS

No controlo realizado em PCA para eventual existência de contaminações, detectaram-se contaminações nos leites fermentados com *L. acidophilus* La-5. Deste modo o trabalho com esta estirpe foi abortado durante a produção e nenhum resultado será apresentado para estes leites fermentados. Nas restantes condições não se verificaram contaminações nas inoculações em PCA que impedissem o prosseguimento de estudos. No leite de vaca fermentado com *B. animalis* Bb-12 embora tenham surgido colónias com diferenças morfológicas ao nível macroscópico, o estudo microscópico não revelou diferenças significativas e o estudo deste leite fermentado não foi abortado; na discussão dos resultados este dado será tido em conta.

Na Tabela 10 são apresentados as médias dos valores obtidos para a medição do pH e número de células viáveis, expresso pelo logaritmo de base 10 do número de CFU's por grama de amostra, para os leites inoculados antes da fermentação. A Figura 11 contém as representações gráficas da caracterização dos leites fermentados sendo apresentados os valores médios contidos na Tabela 10 e os valores médios resultantes da determinação dos mesmos parâmetros nas diferentes réplicas biológicas para os leites fermentados nos diferentes pontos de amostragem (dias 0, 14 e 28), com representação do desvio-padrão dos valores determinados para cada réplica biológica.

Tabela 10 – Valores médios obtidos para as medições de pH e contagens de número de células viáveis, apresentado como o logaritmo de base 10 do número de CFU's por grama de leite inoculado, nos leites inoculados com estirpe antes do processo de fermentação. Nota: controlo é previamente acidificado com ácido láctico.

Origem do leite	Controlo		<i>L. casei-01</i>		<i>L. paracasei</i> L26		<i>B. animalis</i> Bb-12	
	pH	pH	log(CFU/g)	pH	log(CFU/g)	pH	log (CFU/g)	
Vaca	4,66	6,03	8,29	6,00	8,43	6,11	7,46	
Cabra	4,80	6,09	8,53	6,11	8,29	6,07	7,53	
Ovelha	4,59	5,99	8,37	6,11	8,19	6,12	7,66	

Ao nível dos leites fermentados controlo, Figura 11A., os valores de pH no leite inoculado são devido ao abaixamento do pH induzido com ácido láctico e, de uma

maneira geral, a variação deste parâmetro ao longo do tempo é pequena e o desvio padrão associado às medições entre as duas réplicas biológicas, representada pelas barras de erro, não é significativo. Após a “fermentação” (incubação a 42°C por 12h), no dia 0, o valor de pH tem tendência a baixar ligeiramente, voltando a subir após 14 dias, em qualquer dos 3 leites em estudo. No caso de leite de cabra a tendência de aumento do pH durante o armazenamento mantém-se até ao dia 28, enquanto nos leites de vaca e ovelha o pH tem tendência a decrescer entre os 14 e os 28 dias de armazenamento. Enquanto os leites dos pequenos ruminantes atingem aos 28 dias um valor de pH idêntico ao valor inicial (Tabela 10), no caso do leite de vaca o pH medido aos 28 dias é ligeiramente superior ao valor determinado para o leite inoculado.

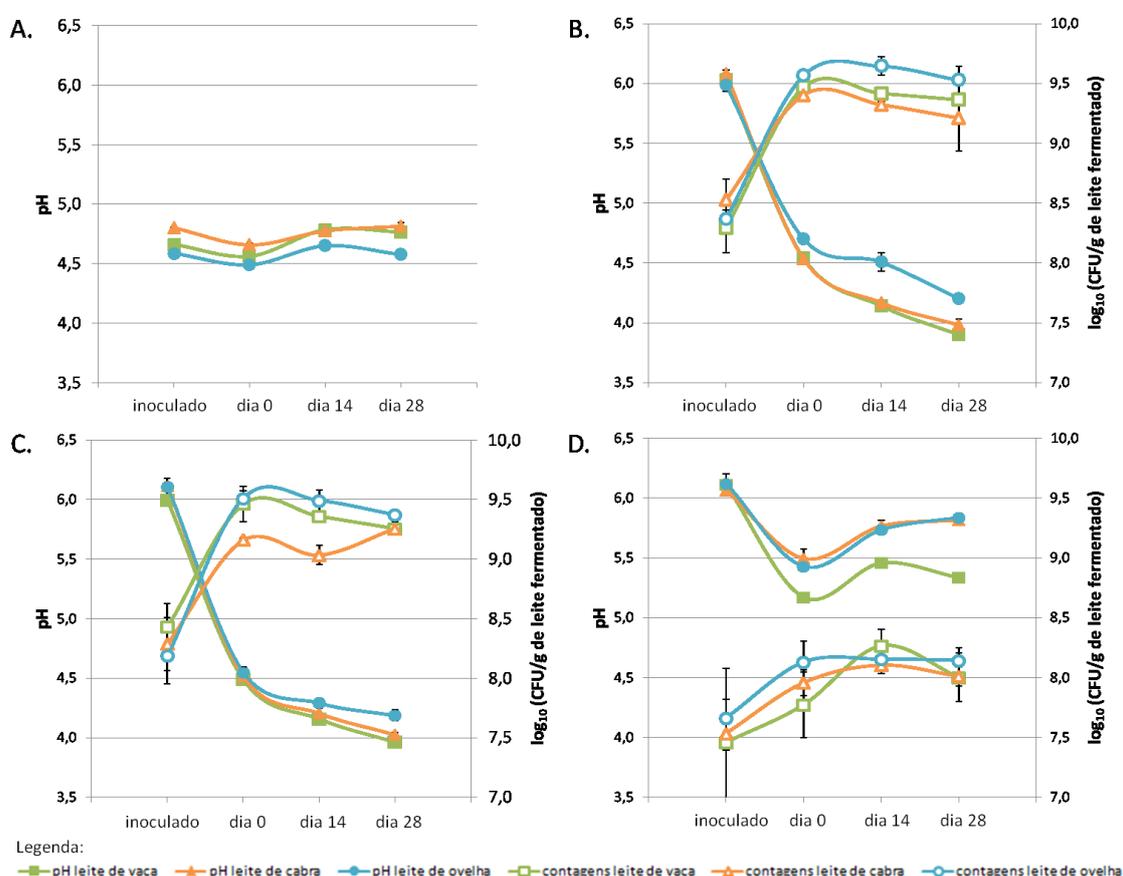


Figura 11 – Representação gráfica da evolução do pH e do número de microrganismos viáveis, com desvios-padrão das réplicas biológicas, nos 3 tipos de leites: quadrados verdes – leite de vaca; triângulos cor-de-laranja – leite de cabra; bolas azuis – leite de ovelha. Símbolos a cheio para os resultados de pH e símbolos sem preenchimento para os resultados das contagens. A. - Controlo (leite fermentado sem estirpe); B. - Leite fermentado com *Lactobacillus casei-01*; C. - Leite

fermentado com *Lactobacillus paracasei* LAFTI® L26; D. -
Leite fermentado com *Bifidobacterium animalis* Bb-12.

A par com os resultados de controlo microbiológico obtidos por inoculação em PCA, a constância dos valores de pH dos leites fermentados controlo ao longo do tempo é também um bom indicador da inexistência de actividade metabólica bacteriana.

Em geral, nos leites fermentados com estirpe inoculada, Figura 11B., C. e D., ao longo do tempo observa-se um decréscimo do pH e um aumento do número de células viáveis. O momento em que estas variações são mais acentuadas é entre a inoculação do leite e o dia 0 de armazenamento, o que corresponde ao momento de fermentação. Nesta fase os microrganismos estão em condições optimizadas para o seu crescimento e isso reflecte-se no aumento do número de células viáveis e na acidificação do meio por parte dos ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético) que são produzidos como consequência do metabolismo de hidratos de carbono das LAB utilizadas durante a fermentação [5, 35]. Estas tendências são mais evidentes nos leites fermentados com *L. casei-01* (Figura 11B.) e *Lactobacillus paracasei* LAFTI® L26 (Figura 11C.), os quais após a fermentação, e durante o período de armazenamento, tendem a registar uma diminuição bastante menos acentuada de pH e um ligeiro decréscimo do número de células viáveis.

Nos leites fermentados com *Bifidobacterium animalis* Bb-12, Figura 11D., o pH tende a aumentar ligeiramente nos leites de cabra e ovelha durante o tempo de armazenamento, ao contrário do que sucede nos leites fermentados com *L. casei-01* e *L. paracasei* LAFTI® L26. Ainda comparativamente a estes leites, é importante referir que a diminuição do pH é muito menor nos leites fermentados com *B. animalis* Bb-12. O leite de vaca fermentado com *B. animalis* Bb-12 não segue a tendência de aumento do pH ao longo do período de armazenamento, contudo devido às questões levantadas sobre as morfologias observadas durante as análises microbiológicas, não é possível afirmar que esta alteração se deva a um melhor desempenho da estirpe no leite de vaca.

Ainda relativo aos leites fermentados com *B. animalis* Bb-12 é importante referir o menor desempenho desta estirpe comparativamente aos leites fermentados com estirpes de lactobacilos. Sobretudo nos leites de cabra e ovelha, é evidente o menor crescimento da estirpe durante a fermentação que tende a manter estável o número de células viáveis durante o período de armazenamento. Ao nível das contagens de células

o leite de vaca também apresenta desvios à tendência apresentada pelos leites dos pequenos ruminantes, mas, pelas razões já apresentadas na discussão dos valores de pH nestes leites, nada se pode concluir acerca desta observação.

Duma forma geral, o menor desempenho da *B. animalis* Bb-12 comparativamente às outras duas estirpes em estudo pode ser observado como uma consequência do sistema proteolítico menos eficiente desta estirpe, o qual não é composto por qualquer protease, e conseqüentemente da necessidade de uma fonte de azoto disponível [48].

Comparando de forma global o desenvolvimento das estirpes nos 3 tipos de leite do ponto de vista do número de células viáveis, observa-se um melhor desempenho de todas as estirpes nos leites fermentados de ovelha e um desempenho pior no leite de cabra. No caso particular do leite de cabra fermentado com *L. paracasei* LAFTI® L26 (Figura 11C.), no dia 14, as contagens são inferiores, contudo, nos últimos 14 dias de armazenamento, observa-se um aumento do número de células viáveis. Isto está em desacordo com a tendência observada para os leites de outras origens e poderá sugerir uma adaptação da estirpe às condições do meio durante a segunda metade do armazenamento. Da análise da Figura 11 verifica-se ainda que os leites fermentados de ovelha apresentam valores de pH ligeiramente superiores apesar de o número de células viáveis também serem superiores. Este aparente contra-senso poderá dever-se à maior capacidade tamponante descrita na literatura para o leite desta origem [2].

À semelhança do que se observa nos leites fermentados controlo, os valores de pH variam muito pouco entre as réplicas biológicas dos leites fermentados com estirpes. Já no que diz respeito ao número de células viáveis, os desvios-padrão entre as duas réplicas biológicas são bastante mais significativos.

Em qualquer dos leites fermentados com estirpe observa-se os maiores desvios-padrão nos inoculados, o que estará muito provavelmente associado a diferenças no crescimento do inóculo reactivado. Contudo, para os leites fermentados com *L. casei-01* e *L. paracasei* LAFTI® L26, também é possível observar que as diferenças entre réplicas biológicas ou entre as quantidades inoculadas da mesma estirpe nos leites de diferentes origens, desaparecem ou diminuem significativamente após a fermentação. Ainda nestas duas estirpes, ao longo do período de armazenamento observa-se nos leites fermentados com *L. paracasei* LAFTI® L26 uma uniformidade na evolução das réplicas

biológicas durante os 28 dias, enquanto na *L. casei-01* apenas o leite de vaca mantém réplicas biológicas com desvio-padrão insignificante, pois nos leites dos pequenos ruminantes observa-se uma grande variação entre as duas réplicas biológica, situação que é particularmente evidente no leite de cabra.

Nos leites fermentados com *B. animalis* Bb-12 os desvios-padrão entre as réplicas biológicas após a fermentação são muito maiores e muito mais significativos na validação da tendência observada. Estas diferenças entre réplicas biológicas reflectem um crescimento aleatório da estirpe em condições de fermentação idênticas, o que poderá ser resultado do sistema proteolítico da estirpe que depende da lise celular para iniciar a proteólise das proteínas do leite através das endopeptidases. Este indício de crescimento aleatório, provavelmente associado a uma proteólise desorganizada, poderá levar, em última análise, a um fraco rendimento desta estirpe como produtora de péptidos bioactivos. Neste sentido, mais estudos deveriam ser realizados tentando otimizar o crescimento da estirpe para aumentar a reprodutibilidade entre réplicas.

Através da análise estatística, por ANOVA, confirma-se o papel importante que o tipo de leite tem ao influenciar significativamente ($p < 0,05$) os dois parâmetros em estudo. Estes parâmetros sofrem ainda influência estatisticamente significativa consoante a estirpe inoculada, e esta é, de entre todas as variáveis independentes (tipo de leite, estirpe inoculada ou tempo de amostragem), aquela que tem mais influência sobre a forma como os parâmetros em análise são influenciados. O pH, para além de ser influenciado de forma estatisticamente significativa pelo tipo de leite e pela estirpe inoculada, é também influenciado pelo tempo, pela conjugação das 3 variáveis (efeito de interacção) e pela conjugação de todos os pares possíveis das 3 variáveis.

Pela consulta da Figura 11 é possível afirmar que a estirpe com maior número de células viáveis durante todo o tempo de armazenamento e para qualquer dos leites em estudo é a *L. casei-01*. É também para esta estirpe que se registam os valores mais baixos de pH aos 14 e aos 28 dias de armazenamento, contudo na amostragem dos 0 dias não se verifica a relação entre o menor valor de pH e o maior número de células viáveis.

Do ponto de vista de veículo para probióticos, durante todo o tempo de armazenamento, todos os leites fermentados em estudo excedem o intervalo de 10^6 a 10^7 CFU/g de leite fermentado (Figura 11B., C. e D.), não sendo em nenhum dos casos

necessário o consumo de 100g de produto para garantir a ingestão diária de 10^8 a 10^9 células viáveis de probiótico conforme recomendado [35, 56].

O outro parâmetro analisado na caracterização dos leites fermentados foi a percentagem de sólidos totais. Através da análise estatística por ANOVA conclui-se que o tipo de leite é a única variável que influencia de forma significativa ($p < 0,05$) a percentagem de sólidos totais neste estudo. Neste panorama faz sentido falar em valores médios de sólidos totais em cada leite, que são: 13,18% (desvio-padrão (σ) =0,20) no leite de vaca; 14,01% (σ =0,47) no leite de cabra; e 20,64% (σ = 1,23) no leite de ovelha.

Atendendo à metodologia utilizada na preparação dos leites fermentados e ao facto de durante todo o tempo de amostragem não haver desperdício de nenhuma parte do produto, era expectável que a variação só fosse significativa entre leites e não ao longo do tempo ou consoante a estirpe utilizada. As percentagens de sólidos totais determinadas para cada tipo de leite estão de acordo com os dados apresentados na Tabela 1, uma vez que os leites de cabra e de vaca, que são os que apresentam menor teor de sólidos, são também os que têm menor conteúdo em nutrientes. Ainda entre estes dois leites, é possível observar um teor de sólidos totais ligeiramente superior no leite de cabra, o qual se destaca do leite de vaca pelos teores de lípidos e proteínas ligeiramente superiores.

4.2. EXTENSÃO DA PROTEÓLISE

A extensão da proteólise foi avaliada pelo método de kjeldahl e os teores de azoto solúvel (% WSN/N total) e azoto não proteico (% NPN/N total) são apresentados na Figura 12. Como já foi referido no capítulo anterior, as amostras foram determinadas por dois procedimentos do método de kjeldahl ligeiramente diferentes. Para garantir que o procedimento não interferia na quantificação de azoto, foi realizado um teste que consistiu na quantificação de amostras utilizando os dois procedimentos. Dos resultados do teste foi possível concluir que o erro associado à quantificação por métodos diferentes (2 a 6%) estava dentro do erro aceite entre a quantificação de dois duplicados da mesma amostra (menos de 10%). A quantificação de amostras pelos métodos de macro- e micro-kjeldahl foi realizada de forma aleatória e, atendendo aos resultados da

comparação dos métodos, não serão identificadas as amostras quantificadas por cada um dos métodos.

As quantidades totais de azoto determinadas para cada tipo de leite fermentado, expressas em mg de azoto por g de leite fermentado, foram 4,63 para o leite de vaca, 5,75 para o leite de cabra e 8,83 para o leite de ovelha. Perante estes resultados, pode afirmar-se que as quantidades de azoto relativas de cada tipo de leite utilizado neste estudo estão de acordo com a relação entre os conteúdos proteicos de cada tipo de leite apresentados na Tabela 1.

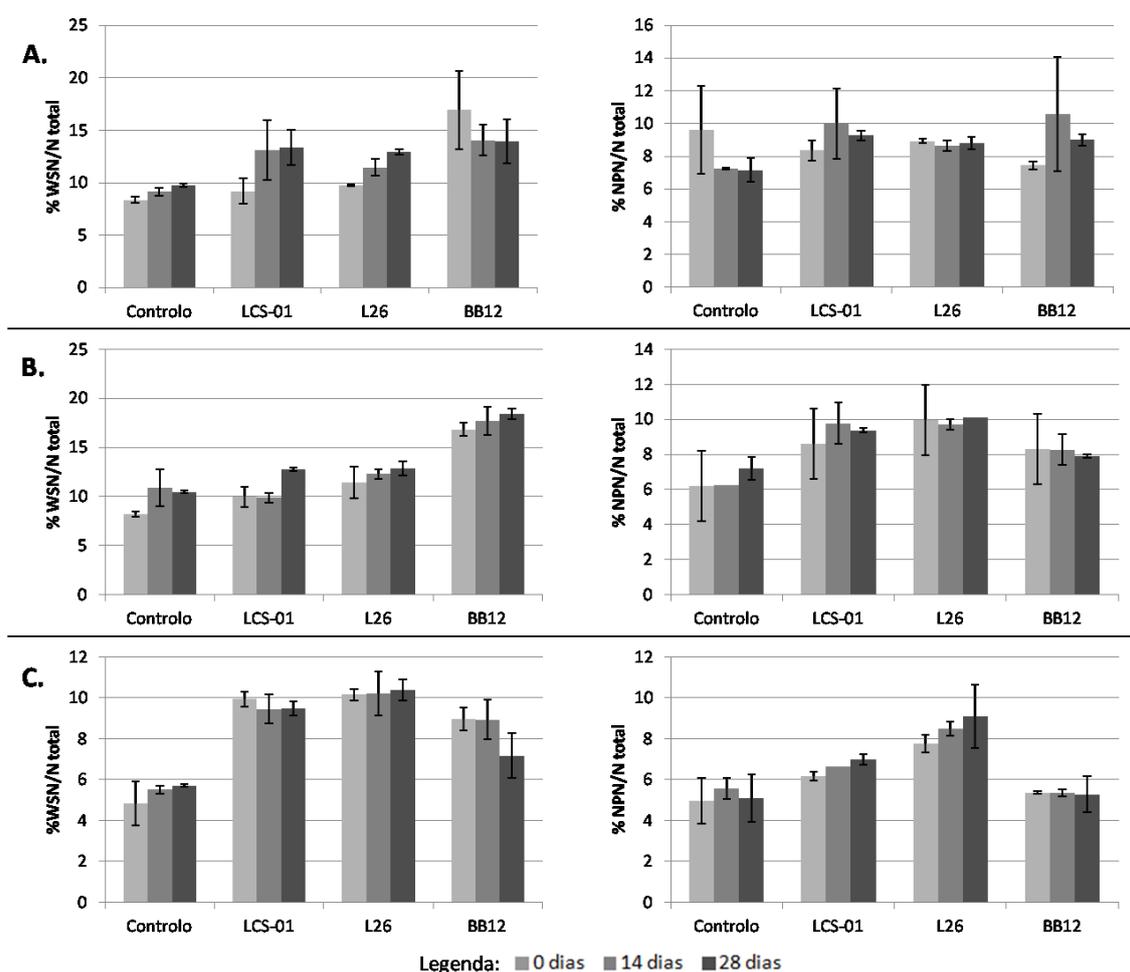


Figura 12 – Evolução das fracções de azoto solúvel (WSN) e azoto não-proteico (NPN) para os leites fermentados de vaca (A.), leites fermentados de cabra (B.) e leites fermentados de ovelha (C.), controlo e inoculados com *Lactobacillus casei-01* (LCS-01), *L. paracasei* LAFTI® L26 (L26) e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 (BB12), aos 0 d (■), 14 d (■), e 21 d (■) de armazenamento.

Analisando a Figura 12, uma das primeiras observações que é possível fazer é que a dimensão dos desvios observados entre réplicas biológicas é em muitos casos superior à variação que se observa ao longo do tempo. Apesar do cenário apresentado, os resultados serão discutidos com base nos valores médios, de acordo com a capacidade proteolítica das estirpes e atendendo às condições de armazenamento e ao equilíbrio entre a formação e consumo dos péptidos.

Relativamente aos leites fermentados controlo, era expectável que ao longo do tempo as fracções de azoto solúvel se mantivessem constantes ou que se registasse um ligeiro aumento devido à acção da plasmina cuja completa inactivação não foi garantida com o tratamento térmico aplicado ao leite neste trabalho [3, 21]. A única fracção onde se verifica uma tendência clara, significativa e dentro do esperado é na fracção WSN do leite de vaca. Nos restantes leites, quer nas fracções WSN ou NPN, não é possível observar tendências claras nos controlos.

No que diz respeito à acção das estirpes probióticas em estudo e de acordo com os dados recolhidos na literatura, seria expectável que a estirpe menos proteolítica fosse a *B. animalis* Bb-12 e que a *L. paracasei* LAFTI® L26 e a *L. casei-01* se destacassem do ponto de vista proteolítico [61]. Esta tendência é observada apenas no leite de ovelha, Figura 12C., onde é possível observar uma diferença significativa entre as fracções WSN do controlo e das estirpes. Isto evidencia a maior extensão da proteólise nos leites de ovelha fermentados com estirpe. Ainda dentro desta fracção e no leite de ovelha, observa-se que os leites fermentados com lactobacilos apresentam um teor de azoto solúvel superior ao leite fermentado com *B. animalis* Bb-12, sendo o leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI® L26 aquele que apresenta os valores de azoto solúvel superiores, ainda que este destaque seja pouco significativo. No que concerne os teores de azoto não proteico nos leites de ovelha, torna-se mais evidente a maior capacidade proteolítica das estirpes de lactobacilos, em particular da *L. paracasei* LAFTI® L26, em comparação com a estirpe de *Bifidobacterium*. Contudo, as diferenças entre as estirpes e o controlo são menos evidentes, sugerindo no caso da *B. animalis* Bb-12 que a viabilidade da estirpe é garantida pelo consumo da fracção de péptidos existentes no leite que são produzidos por acção alternativa ao metabolismo bacteriano, razão pela qual os valores de NPN encontrados nos leites fermentados com *B. animalis* Bb-12 são inferiores aos quantificados para o leite fermentado controlo. Já nos leites fermentados com *L. casei-01* e *L. paracasei* LAFTI® L26, a fracção de NPN é superior aos valores

determinados para o controlo e observa-se também uma tendência para o aumento da fracção NPN ao longo do tempo de armazenamento, a qual não é visível para as fracções WSN destes leites fermentados.

As tendências observadas nos leites fermentados de ovelha ao longo dos tempos de amostragem para a *L. paracasei* LAFTI[®] L26 e a *L. casei-01* sugerem que, nas condições de armazenamento, as peptidases estão mais activas que as proteases. Por esta razão a quantidade de péptidos (% NPN/N total) aumenta ao longo do tempo e a quantidade de proteínas e péptidos solúveis (% WSN/N total) tende a manter-se constante no leite com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 ou diminuir no leite com *L. casei-01*, sugerindo que os péptidos formados durante o armazenamento são maioritariamente produzidos através da hidrólise de proteínas já solúveis no início do armazenamento. Nos leites fermentados de ovelha fermentados com *B. animalis* Bb-12 as tendências observadas ao longo do tempo são de diminuição das duas fracções de azoto, com especial destaque para a fracção WSN na última metade do tempo de armazenamento. Apesar da tendência de diminuição da fracção NPN ser muito ligeira, a diminuição das fracções azotadas ao longo dos tempos de amostragem, sugere que nas condições de armazenamento o já fraco sistema proteolítico da *B. animalis* Bb-12 está muito pouco activo.

Nas fracções WSN dos leites fermentados de vaca e cabra, a estirpe mais proteolítica aparenta ser a *B. animalis* Bb-12 e o potencial proteolítico dos lactobacilos parecem não se destacar em comparação com o controlo. Apesar do menor potencial proteolítico destas estirpes, é possível observar alguma tendência para o aumento da fracção WSN ao longo do tempo, sendo mais evidente nos leites com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 e particularmente significativa ($p < 0,05$) no leite de vaca fermentado com esta estirpe. Nas fracções WSN dos leites de vaca e cabra fermentados com *B. animalis* Bb-12 ao longo do tempo observam-se duas tendências opostas, enquanto no leite de vaca a fracção WSN tende a diminuir nos primeiros 14 dias de armazenamento e manter-se constante nos últimos 14 dias, no leite de cabra a tendência é para aumentar o teor de WSN ao longo das amostragens.

No que diz respeito às fracções NPN dos leites fermentados de vaca e cabra a *B. animalis* Bb-12 já não se destaca como estirpe mais proteolítica, contudo as diferenças nas capacidades proteolíticas das três estirpes não são tão evidentes como no leite de

ovelha. Relativamente às fracções NPN nos leites de vaca e cabra fermentados com *B. animalis* Bb-12, observa-se uma tendência de diminuição ao longo do tempo no leite de cabra e uma aparente tendência de aumento procedido por decréscimo no leite de vaca. Já as fracções NPN dos leites de cabra e vaca fermentados com lactobacilos parecem manter-se em ambos os leites e estarem em desacordo com o observado no leite de ovelha. Enquanto nos leites de cabra e vaca fermentados com *L. casei-01* a tendência que se observa é para o aumento da fracção NPN na primeira metade do armazenamento e diminuição na última metade, na fermentação com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 as fracções NPN correspondentes tendem a registar uma tendência oposta, isto é, elas tendem a registar uma diminuição seguida de um aumento durante o armazenamento.

Dum modo geral, comparando os 3 tipos de leite, observa-se que os teores de azoto são superiores e muito idênticos nos leites de vaca e cabra. Apesar desta observação não se pode afirmar que as estirpes tenham um melhor desempenho proteolítico nos leites com maiores teores de azoto. Nesta comparação é preciso atender ao tratamento dos dados obtidos na quantificação de azoto pelo método de kjeldahl os quais são apresentados relativizados para o teor de sólidos e teor de azoto total de cada leite. Considerando que o leite de ovelha é aquele que apresenta uma maior percentagem de sólidos totais e também aquele que tem maior conteúdo proteico, é compreensível que as fracções WSN e NPN dos leites de ovelha representem uma percentagem menor do valor total de azoto. Já os leites de vaca e ovelha têm teores de sólidos totais e proteína muito semelhantes, o que já nos permite comparar a capacidade proteolítica das estirpes nos dois leites, não sendo contudo a destacar grandes diferenças nas capacidades proteolíticas através dos dados apresentados.

O tratamento estatístico dos dados obtidos na quantificação de azoto, feito através de ANOVA, permite corroborar as tendências descritas anteriormente pelo que o tipo de leite, a estirpe inoculada e a combinação entre estas duas variáveis influenciam de forma significativa ($p < 0,05$) os resultados obtidos para as fracções WSN e NPN. Por sua vez, o tempo de amostragem só tem uma influência significativa nos resultados obtidos para a fracção NPN, pelo que pode afirmar-se que as diferenças observadas nas fracções WSN ao longo do tempo já descritas não são significativas do ponto de vista estatístico.

Pela análise realizada através do teste de Tukey, conclui-se que apenas existem diferenças estatisticamente significantes ao longo do tempo nas fracções WSN do leite de vaca fermentado com *L. paracasei* LAFTI® L26 e no leite controlo da mesma origem, conforme discutido anteriormente. Em qualquer dos casos a relação estatística encontrada para os 3 tempos de amostragem foi que o valor de azoto solúvel determinado para os 14 dias está estatisticamente relacionado ($p < 0,05$) com os valores de azoto quantificados para os dias 0 e 28, os quais não apresentam entre si significância estatística.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Como já foi referido, a identificação no leite de péptidos com actividade anti-hipertensiva tem merecido especial destaque. Neste trabalho só foi feita determinação de actividade anti-hipertensiva para as fracções com $PM < 3kDa$, e nestas fracções só algumas das amostras dos leites fermentados foram testados. Nas determinações realizadas para as amostras já identificadas no capítulo dos Materiais e Métodos não foi possível calcular um IC_{50} para a proteína da amostra devido à inexistência de uma relação linear entre o inverso da concentração de proteína na diluição e o inverso da percentagem de inibição provocada por essa diluição.

Após a análise inicial do lote aleatório de amostras e tendo em conta os resultados apresentados na literatura que descrevem um leite de vaca fermentado com *Lactobacillus casei* com actividade anti-hipertensiva [81], optou-se por testar os leites de vaca fermentados com *Lactobacillus casei-01* aos diferentes tempos de amostragem. Os resultados obtidos para os leites fermentados com 0 e 14 dias de amostragem não diferiram do já descrito para o lote aleatório de amostras.

Tendo em conta os resultados obtidos para as amostras testadas, considerando os custos da análise de todas as amostras e os resultados obtidos num estudo paralelo com queijos preparados a partir do mesmo leite e com algumas das estirpes probióticas utilizadas neste trabalho, nos quais foi possível encontrar amostras com actividade anti-hipertensiva, optou-se por abandonar o estudo desta bioactividade. Nesta perspectiva, não é possível afirmar que nas condições do trabalho (origem do leite, estirpe probiótica utilizada, metodologia de produção dos leites) nenhum dos leites preparados tem actividade anti-hipertensiva. Contudo é possível fazer esta afirmação para todos os leites

testados e concluir que as condições testadas se perspectivam pouco interessantes na obtenção de péptidos com actividade anti-hipertensiva.

Os resultados obtidos para a determinação da actividade anti-hipertensiva não reflectem os resultados descritos na literatura. Estudos recentes que documentam actividade anti-hipertensiva em leites fermentados com estirpes de *Lactobacillus casei* [52, 78, 81] e *Lactobacillus paracasei* [52, 113], utilizam como leite de partida o *skim milk* [52, 81] ou leite de cabra (raça Ionica, Itália) [78] e ovelha [113] de raças diferentes da utilizada neste trabalho. As condições de fermentação também apresentam algumas diferenças, quer ao nível da temperatura, que nalguns casos [78, 81, 113] é inferior à utilizada neste trabalho, entre 30 e 37°C, ou ao nível do tempo que varia entre 7,5h e 24h. Nas condições destes trabalhos, bastante semelhantes às condições deste estudo, foi possível determinar decréscimos de actividade de ECA entre 30 a 70% com determinações de IC₅₀ com valores entre 0,15-0,35mg/mL.

Perante estes resultados, era expectável conseguir alguma actividade anti-hipertensiva nas amostras, particularmente aos 0 dias de armazenamento. Contudo, os resultados obtidos podem estar relacionados com a origem do leite que pode influenciar os resultados devido aos polimorfismos existentes entre as proteínas dos leites de diferentes raças. Outra explicação possível para a inexistência de resultados pode estar relacionada com a utilização de estirpes de *L. casei* e *L. paracasei* diferentes; conhece-se o carácter estirpe-dependente desta actividade [74]. As condições de fermentação e, em particular, o facto de as actividades serem determinadas após a fermentação, podem justificar a ausência de actividade aos 28 dias de armazenamento. No entanto, a amostragem a este tempo é muito importante pois mimetiza o tempo de prateleira do produto e garante que a actividade biológica está disponível para o consumidor.

4.4. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Esta não é uma bioactividade tão estudada como a actividade anti-hipertensiva e os resultados obtidos são muito mais dependentes do método utilizado na sua determinação. Neste estudo determinou-se a actividade antioxidante de todas as fracções com PM < 3kDa, isto é, foram testados todos os leites fermentados com 0 e 28 dias de armazenamento e uma réplica do leite de vaca fermentado com *L. casei-01* com

14 dias de armazenamento. A determinação desta actividade foi feita pelo método de ABTS e os resultados são expressos em equivalentes de ácido ascórbico na Figura 13.

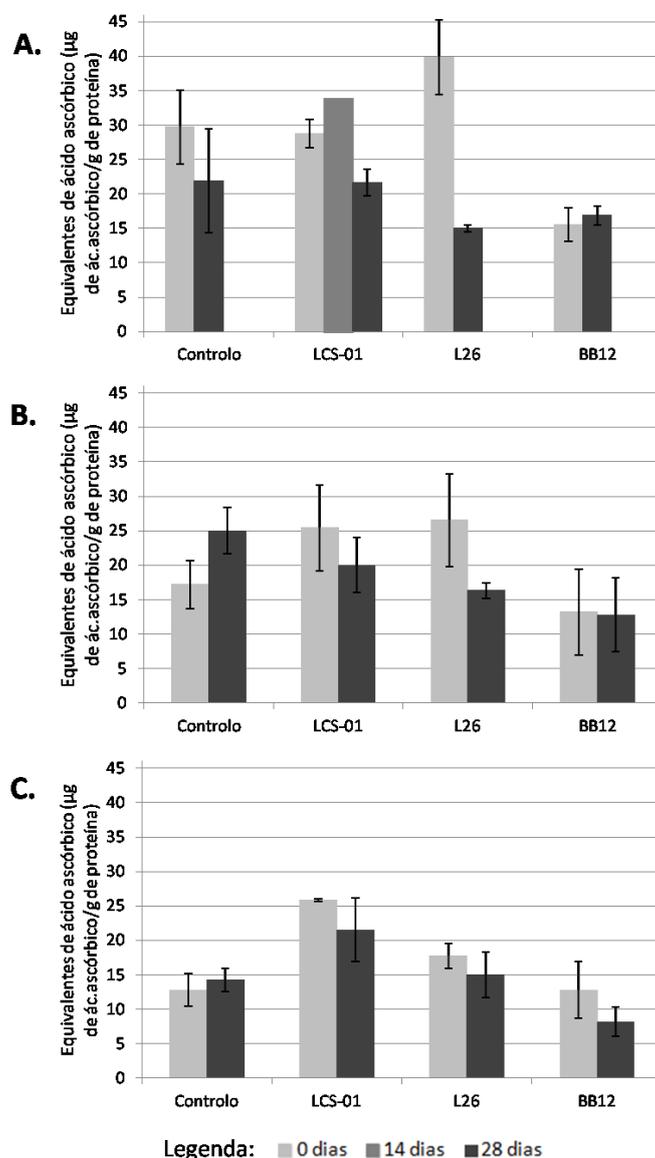


Figura 13 – Evolução dos resultados obtidos para a determinação da actividade antioxidante por ABTS, expressos em equivalentes de ácido ascórbico (μg de ácido ascórbico/g de proteína), nos leites fermentados de vaca (A.), de cabra (B.) e de ovelha (C.) controlo e inoculados com *Lactobacillus casei*-01, *L. paracasei* LAFTI[®] L26 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12, aos 0 d (□), 14 d (■), apenas no leite de vaca fermentado com LCS-01), e 21 d (■) de armazenamento.

Pela análise da Figura 13 observa-se que os desvios-padrão entre as diferentes réplicas biológicas são muito significativos, pondo muitas vezes em causa as diferenças

observadas ao longo do tempo ou entre estirpes. Contudo, apesar da repetição das análises de modo a minimizar os erros, poucas foram as melhorias alcançadas concluindo-se que os desvios observados não se devem a erros experimentais na determinação da actividade e que muito provavelmente estão associados a diferenças efectivas entre as réplicas biológicas. Estas diferenças poderão estar relacionadas com diferenças no desempenho das estirpes ou com o acondicionamento entre procedimentos (armazenamento a -20°C) ser incapaz de reter inalterada a actividade antioxidante das amostras [128]. Uma vez que os desvios entre réplicas não se verificam apenas nos leites fermentados com estirpes mas também nos leites controlo, a possibilidade destas diferenças poderem estar associadas com diferentes resultados da proteólise bacteriana perde força e conclui-se que muito provavelmente estas diferenças decorrem do armazenamento escolhido. Neste sentido propõe-se que este estudo deveria ser realizado com maior número de réplicas biológicas e tendo especial atenção às condições de processamento e armazenamento (exposição ao oxigénio ou à luz, temperatura de armazenamento) de modo a preservar a actividade antioxidante [128].

Duma maneira geral, independentemente da origem ou da estirpe fermentadora, observa-se nos leites fermentados uma tendência para perderem alguma capacidade antioxidante após 28 dias de armazenamento. Uma excepção a esta tendência são os resultados encontrados para o leite de vaca fermentado com *B. animalis* Bb-12, onde se observa uma ligeira tendência para o aumento desta actividade ao fim de 28 dias de armazenamento, contudo perante os desvios-padrão das réplicas biológicas esta variação acaba por não ser significativa ($p > 0,05$). Outra tendência decorrente do tempo de armazenamento que pode ser observada é o aumento desta actividade na primeira metade do armazenamento do leite de vaca fermentado com *L. casei-01*, contudo, devido à indisponibilidade de dados para este tempo de amostragem noutros leites e à indisponibilidade de resultados da réplica biológica desta amostra, este resultado não permite generalizações.

Ainda analisando de forma geral a Figura 13 observa-se que a capacidade antioxidante dos leites de vaca fermentados é superior à observada para os leites das outras origens. O tipo de leite é estatisticamente um dos parâmetros que influencia de forma significativa ($p < 0,05$) os resultados obtidos para a determinação da actividade antioxidante. O outro parâmetro que influencia de forma significativa ($p < 0,05$) os

resultados é a estirpe utilizada para fermentar o leite, o que é particularmente visível nos leites de vaca e ovelha.

Analisando os resultados obtidos para os leites fermentados de vaca, Figura 13A., é importante referir os valores bastante elevados e com grandes desvios-padrão entre réplicas nos leites fermentados controlo. Perante os erros do controlo, pouco é possível concluir acerca dos valores determinados para os leites fermentados com os lactobacilos. Contudo, atendendo apenas ao valor médio determinado para o controlo aos 0 e aos 28 dias observa-se que a fermentação com *L. casei-01* não acrescenta valor antioxidante ao leite de vaca. Por sua vez a fermentação com *L. paracasei* LAFTI® L26 produz um leite fermentado com valor acrescido após a fermentação, mas o que se verifica após 28 dias de armazenamento é que este leite fermentado não só perde capacidade antioxidante, como se torna menos vantajoso comparativamente a um leite sem estirpe fermentadora. Relativamente aos leites fermentados com *B. animalis* Bb-12 a tendência que se observa no leite de vaca é a mesma que se observa nos leites de pequenos ruminantes. A conclusão que se pode retirar dos resultados para esta estirpe é que, apesar do seu potencial probiótico, nas condições em estudo ela parece não ser vantajosa na produção de péptidos com actividade antioxidante pois os resultados obtidos para a sua capacidade antioxidante são ainda menores que os observados no leite fermentado controlo, independentemente do tipo de leite. Este facto pode estar relacionado com o menor crescimento da estirpe que apresenta um número de células viáveis inferior ao determinado para os lactobacilos (diferença de um ciclo logarítmico) que poderá ter influência directa na taxa de actividade metabólica e consequentemente uma produção de péptidos. Neste sentido, seria interessante otimizar condições para obter maior crescimento desta estirpe e verificar se o fraco potencial como produtor de péptidos com actividade antioxidante se mantém.

Ao nível dos leites fermentados de cabra, Figura 13B., os desvios que se observam nos leites fermentados controlo, com *L. casei-01* ou com *B. animalis* Bb-12 são muito grandes e não permitem validar as alterações observadas para estes leites durante o armazenamento. Apesar dos problemas associados à variabilidade das réplicas biológicas parece haver um aumento da capacidade antioxidante do leite sem estirpe, enquanto os leites fermentados com *L. casei-01* e com *L. paracasei* LAFTI® L26 tendem a perder a sua actividade antioxidante após 28 dias de armazenamento. Neste sentido, observa-se para os leites de cabra fermentados com lactobacilos o mesmo que

se observa no leite de vaca fermentado com o *L. paracasei* LAFTI[®] L26, isto é, os leites em questão só são uma mais-valia do ponto de vista antioxidante ao dia 0, pois ao dia 28 do armazenamento o controlo apresenta uma capacidade antioxidante superior. No leite fermentado com *B. animalis* Bb-12, para além do fraco potencial já referido, não existe variação durante o tempo de armazenamento.

Os leites fermentados a partir de leite de ovelha, Figura 13C., são aqueles que apresentam uma perspectiva mais favorável ao nível do potencial antioxidante dos seus péptidos. Nestes leites observa-se um controlo com menores desvios na actividade antioxidante determinada e uma capacidade antioxidante claramente superior nos leites fermentados com *L. casei-01*, em particular no dia 0 do armazenamento, mas que não deixa de ser válido no leite amostrado aos 28 dias. Também o leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 apresenta valores médios superiores ao controlo nos dois dias amostrados, contudo os desvios observados entre réplicas biológicas não permitem validar as diferenças para o controlo, diferenças estas que também são menos expressivas que as observadas para os leites fermentados com *L. casei-01*. Relativamente aos leites fermentados com *B. animalis* Bb-12, para além da sua capacidade antioxidante ser inferior à do controlo, esta ainda diminui aos 28 dias de armazenamento; é de realçar que a actividade média registada por *B. animalis* Bb-12 no leite de ovelha aos 0 d é a mais baixa dos três leites em estudo.

A análise destes resultados à luz da literatura não é tarefa fácil pois esta é uma actividade pouco estudada e não foi encontrada literatura que descreva a capacidade antioxidante destes leites fermentados com estas estirpes. Outro facto que dificulta a comparação dos resultados em termos de valores absolutos entre os vários estudos documentados na literatura está relacionado com os métodos utilizados e a apresentação de resultados. Como já foi referido na Introdução, a capacidade antioxidante determinada é muito dependente do método utilizado [104]. Deste modo, não é correcto comparar resultados obtidos pelo método utilizado, que é um método que determina a actividade antioxidante através do potencial de transferência de electrões entre o oxidante e o antioxidante, com métodos como o ORAC que medem o potencial de transferência de átomos de hidrogénio. Do mesmo modo que métodos com princípios diferentes originam resultados diferentes, também métodos com os mesmos princípios mas com utilização de diferentes oxidantes (ABTS ou DPPH) ou diferentes antioxidantes padrão (ácido ascórbico ou Trolox[®]) geram respostas diferentes [104].

Neste sentido, os resultados presentes neste trabalho deveriam apenas ser comparados com resultados obtidos através pelo método utilizado e quando expressos em equivalentes de ácido ascórbico. Este último ponto revela-se também uma limitação ao nível da comparação de resultados, pois, em diversos estudos realizados com recurso à determinação da capacidade antioxidante de péptidos com ABTS ou DPPH, os resultados são expressos em equivalentes de outro antioxidante padrão (Trolox[®]) ou em percentagem de inibição sem equivalência a um padrão [129-130].

Amirdivani e Baba [130] documentam a determinação da capacidade antioxidante de iogurtes preparados com extractos de plantas usando como controlo um iogurte preparado sem extracto de plantas e através da fermentação com uma cultura de arranque contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12, *Lactobacillus casei-01* e *Streptococcus thermophilus* Th-4. A determinação da actividade antioxidante foi realizada em intervalos de 7 dias durante um período de armazenamento de 28 dias, com DPPH e os resultados são expressos em percentagem de inibição. Em termos absolutos, a percentagem de inibição do iogurte preparado por estes autores é de aproximadamente 30% ao longo de todo o armazenamento, mas, devido ao método utilizado e ao modo como os resultados são apresentados, não é possível estabelecer comparações com os valores obtidos no trabalho que se apresenta. Por sua vez, a tendência observada no estudo de Amirdivani e Baba [130] é independente dos valores absolutos e independente do método uma vez que ambos os métodos assentam nos mesmos princípios. Posto isto, é possível comparar as tendências ao longo do tempo de armazenamento registadas em ambos os estudos, sendo que os resultados que se apresentam neste estudo são corroborados pelo estudo de Amirdivani e Baba [130], no qual se documenta uma tendência para uma capacidade antioxidante inferior ao fim de 28 dias de armazenamento. Ainda relativamente o estudo destes autores é importante notar que durante o período de armazenamento há uma tendência inicial para o aumento da capacidade antioxidante, com um pico máximo na amostragem aos 7 dias, à qual se segue uma fase de decréscimo da actividade antioxidante ao longo do tempo. A tendência descrita sustenta os resultados obtidos para os 14 dias de armazenamento do leite de vaca fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26, perspectivando a possibilidade desta tendência se estender às restantes condições testadas neste trabalho.

Seria particularmente interessante confirmar a tendência aos 14 dias de armazenamento, uma vez que se pretende avaliar a disponibilidade para o consumidor da actividade antioxidante durante o tempo de prateleira do produto. Considerando que ao fim de 28 dias de armazenamento se observa uma perda de potencial antioxidante em todos os leites fermentados testados e valores absolutos inferiores aos determinados para o controlo nos leites fermentados de vaca e cabra, a confirmação da tendência de aumento da capacidade antioxidante na amostragem dos 14 dias seria um excelente indício do potencial dos probióticos em estudo na produção de leites fermentados com actividade antioxidante com benefício para o consumidor nos primeiros 14 dias após a produção.

Sabeena Farvin et al [131] e Hernández-Ledesma et al [129] também realizaram estudos em que avaliam a capacidade antioxidante de iogurtes e leites fermentados, respectivamente. Em qualquer destes estudos, nenhuma comparação pode ser estabelecida com o trabalho em discussão, pois apesar de as matrizes estudadas se assemelharem aos leites fermentados deste trabalho experimental e de os métodos utilizados para determinar a actividade antioxidante assentarem nos mesmos princípios (DPPH e ABTS), os resultados são expressos em percentagem de inibição ou em equivalentes de Trolox[®]. Nestes estudos o ponto de amostragem é feito a um tempo único e no estudo de Hernández-Ledesma et al [129], que apresenta resultados em equivalentes de Trolox[®], a capacidade antioxidante é determinada para fracções do extracto solúvel da amostra obtidas por separação por RP-HPLC, o que consiste noutra limitação à comparação de resultados uma vez que no trabalho que se discute a actividade é determinada para a fracção de PM < 3kDa inteira e não se pode assumir equivalência entre as fracções do estudo de Hernández-Ledesma et al [129] e as fracções deste trabalho.

A escolha das amostras a analisar por espectrometria de massa (MS) foi feita com base nos dados obtidos para esta actividade. Nesta escolha optou-se por leites fermentados com 0 dias de armazenamento pois, de entre as fracções de PM < 3kDa preparadas, são estes os que apresentam maior capacidade antioxidante e uma diferença mais significativa para o controlo. Optou-se por analisar uma réplica de cada leite de ovelha fermentado de modo a avaliar o efeito da estirpe. Neste sentido foram escolhidas as réplicas com maior diferença para o controlo, no qual se escolheu a réplica com

menor actividade antioxidante. Deste modo, todos os leites fermentados com estirpe analisados por MS apresentavam actividade superior à do controlo.

De modo a avaliar o efeito do leite foram analisadas uma das réplicas dos leites de vaca e cabra fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 e respectivos leites controlo, tendo-se optado de novo pela escolha das réplicas com maior actividade no caso dos leites fermentados com estirpe e menor actividade nos leites controlo. A escolha pelos leites fermentados com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 deveu-se ao facto de ser a estirpe que induz maiores alterações na capacidade antioxidante no conjunto dos leites de vaca e cabra, pois apesar de ter uma actividade mais modesta no leite de ovelha a análise deste leite já estava incluída na análise do efeito das estirpes.

4.5. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para as amostras analisadas por HPLC-MS, foi previamente obtido um perfil de HPLC. Estes espectros permitiram estimar a semelhança entre os perfis peptídicos das diferentes amostras. Duma maneira geral, os espectros obtidos têm o aspecto do cromatograma apresentado na Figura 14, com picos ao tempo de retenção entre os 7 e os 15min decorrentes da eluição dos péptidos da fracção e a tempos de retenção superiores a 45min, momento em que a fracção de eluente A é de 90% e já não há eluição de péptidos [132]. Perante isto importa comparar os perfis de HPLC das amostras ao tempo de retenção entre 7 a 15min.

Na Figura 15 apresentam-se os perfis de HPLC entre os tempos de retenção 5 e 15min para todas as amostras analisadas. Pela análise desta figura, observa-se que os perfis das fracções com $PM < 3kDa$ dos leites fermentados de vaca com 0 dias de armazenamento (Figura 15A.) são bastante diferentes das dos leites fermentados com leites de pequenos ruminantes (Figura 15A. e B.). Dentro dos perfis dos leites fermentados de vaca destaca-se sobretudo a intensidade dos sinais, que é superior no caso do leite controlo.

Observando agora as fracções dos leites de cabra (Figura 15A.) constata-se que os perfis das fracções com $PM < 3 kDa$ do leite controlo e do leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 com 0 dias de armazenamento são semelhantes, contudo é difícil associar inequivocamente algum pico entre as duas fracções.

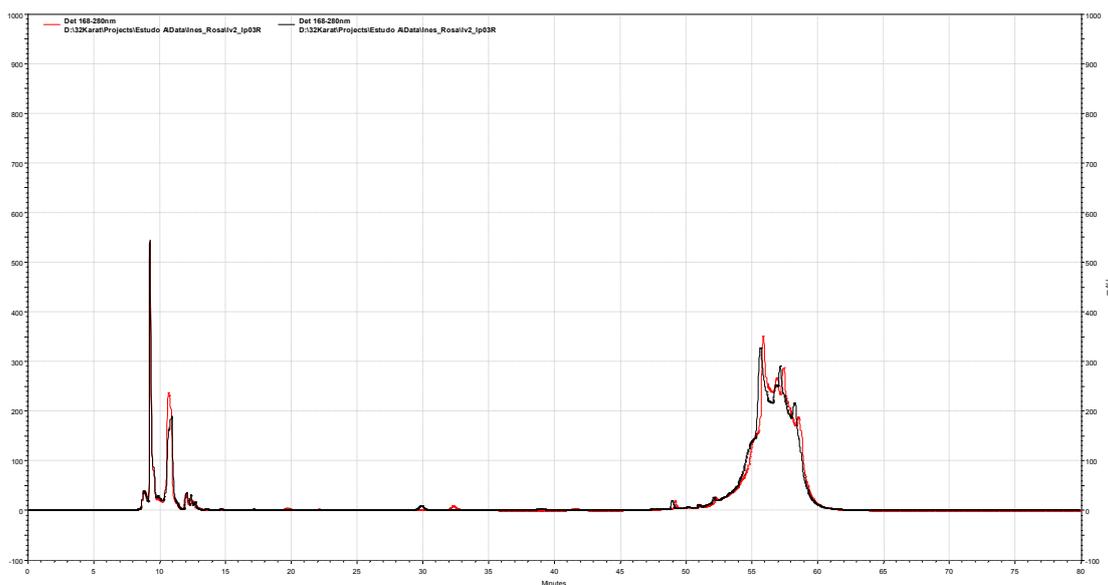


Figura 14 – Cromatograma de HPLC obtido para a fracção com PM < 3kDa do leite de vaca fermentado com *L. paracasei* LAFTI® L26 com sobreposição dos espectros obtidos para as duas injecções desta amostra. A escala vertical representa a intensidade do pico, expressa em mAU, com valor mínimo -100 e máximo 1000. A escala horizontal representa o tempo de retenção, expresso em minutos, com valor mínimo 0 e máximo 80.

Da análise dos perfis das fracções com PM < 3kDa dos leites de ovelha com 0 dias de fermentação (Figura 15B.) observam-se perfis muito semelhantes para as 4 condições (estirpe inoculada) testadas. Nestas fracções destaca-se o pico presente nos leites fermentados com *L. paracasei* LAFTI® L26, com *B. animalis* Bb-12 e leite controlo que quase não se detecta na *L. casei-01*, que está assinalado na Figura 15B. com setas para a esquerda (↵). Outra observação interessante está assinalada com setas para a direita (↷) e é um pico comum às fracções dos leites fermentados com os lactobacilos, esta observação é uma das diferenças mais visuais entre estes leites e o leite fermentado com *B. animalis* Bb-12 e controlo, cujos perfis são mais semelhantes entre si.

Após a aquisição dos espectros de HPLC para as fracções com PM < 3kDa dos leites fermentados seleccionados a partir dos resultados da actividade antioxidante obtidos para, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa e espectrometria de massa tandem. Para esta análise apenas são apresentados os números de picos em cada amostra uma vez que não foi possível identificar nenhum péptido responsável pela actividade determinada nas diferentes fracções. De notar que esta

aproximação foi exploratória, apenas com o intuito de determinar a complexidade da amostra, de forma a ser possível programar experiências posteriores. Estes resultados são apresentados na Tabela 11.

Os dados apresentados na Tabela 11 foram obtidos, para cada amostra, através da análise do espectro de massa global obtido pela soma de todos os espectros de massa adquiridos ao longo da experiência de HPLC-MS. Na análise do espectro global, para os picos com maior abundância relativa, observou-se a variação da intensidade do sinal (m/z) ao longo do tempo. Quando o ião apresentava contagens idênticas em todos os espectros adquiridos ao longo do tempo, considerou-se que este ião corresponde a uma substância contaminante e que surge como ruído de fundo, não correspondendo portanto a nenhuma substância peptídica. Nos casos em que o ião apresenta contagens significativamente superiores em espectros consecutivos durante um pequeno período de tempo, assumiu-se que a molécula eluída naquele tempo de retenção, corresponde a uma molécula de natureza peptídica. Na Figura 16 apresenta-se um exemplo da análise descrita acima para a identificação dos picos da amostra. Na Figura 16B. mostra-se um excerto do espectro de massa onde se observa o pico de m/z 679,68 (pico mais abundante à em baixo à esquerda). Na Figura 16A. observa-se o cromatograma de HPLC-MS do ião com m/z 679,7, observando-se claramente que este eluí com um pico com o tempo de retenção de 23,8 minutos, tendo assim sido considerado um composto de natureza peptídica. Quando possível, fez-se uma breve análise dos espectros de MS/MS que permitiu confirmar esta identificação. Todavia, nem sempre a qualidade dos espectros de massa tandem permitiram uma identificação inequívoca da natureza dos iões identificados.

Da análise da Tabela 11 observa-se para o leite de vaca uma contagem de picos superior no controlo comparativamente ao leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26, o que de certo modo está de acordo com a maior intensidade do sinal detectado no perfil de HPLC de leite de vaca controlo (Figura 15A.) e com uma quantificação ligeiramente superior de azoto não-proteico no leite controlo em comparação com o leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 (Figura 12A.). Contudo quando se relaciona o número de picos destas fracções com a actividade antioxidante determinada, estes números não reflectem a maior actividade antioxidante do leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26.

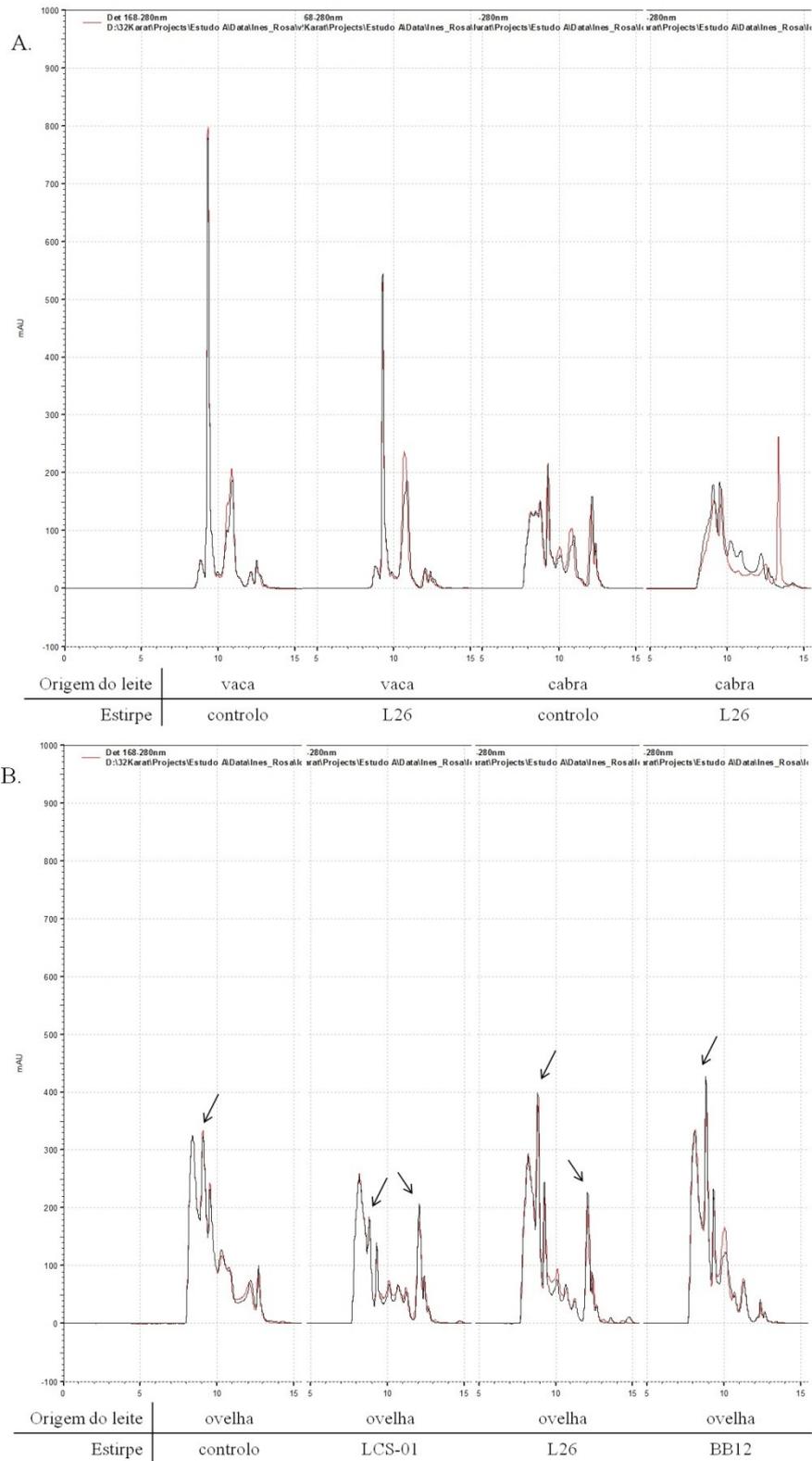


Figura 15 – Cromatogramas obtidos por HPLC ao tempo de retenção 5 a 15min obtidos para as fracção com PM < 3kDa das combinações origem do leite/estirpe apresentadas abaixo de cada perfil, apresentados com sobreposição dos espectros obtidos para as duas injecções desta amostra. A escala vertical

representa a intensidade do pico, expressa em mAU, com valor mínimo -100 e máximo 1000. A escala horizontal representa o tempo de retenção, expresso em minutos, com valor mínimo 5 e máximo 15 para cada perfil.

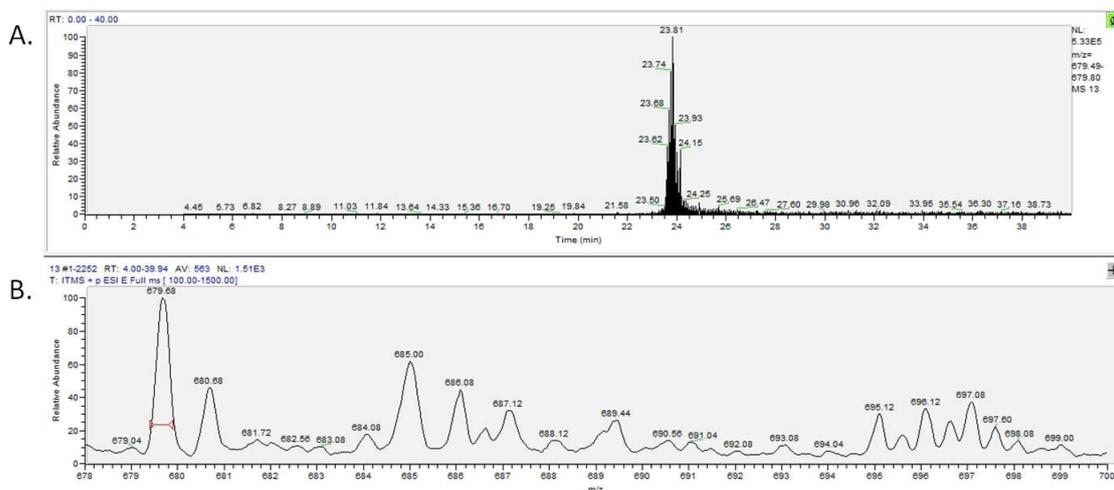


Figura 16 – Exemplo da metodologia utilizada para identificação de péptidos nas diferentes amostras. Neste exemplo mostra-se a identificação do péptido com m/z 679,6. Em A. mostra-se o cromatograma HPLC-MS do ião com m/z 679,6. Na figura B. apresenta-se uma ampliação do espectro de massa (m/z 678-700) adquirido no intervalo de tempo 23-25 minutos.

Tabela 11 – Número de picos identificados nos espectros de MS de cada fracção. Os números de picos comuns e únicos, são os picos comuns e únicos entre os espectros dos leites da mesma origem.

Origem do leite	Vaca		Cabra		Ovelha				
	Estirpe	controlo	L26	controlo	L26	controlo	LCS-01	L26	BB12
Nº total de picos		36	21	49	103	72	166	64	23
Nº de picos comuns		7	7	9	9	21	21	26	15
Nº de picos únicos		29	14	29	83	51	135	38	8

Legenda: L26: *L. paracasei* LAFTI[®] L26; LCS-01: *L. casei-01*; BB12: *B. animalis* Bb-12

Nas fracções de leites de cabra analisados por MS observa-se um maior número de picos na fracção de leite fermentado com *L. paracasei* LAFTI[®] L26 o que de certo modo está de acordo com a quantificação dum maior teor de azoto na fracção NPN destes leites fermentados, podendo também estabelecer-se para as fracções destes leites de cabra fermentados uma relação directa entre o número de péptidos e a capacidade antioxidante determinada.

Tabela 12 – Distribuição dos picos comuns encontrados na análise por MS nas fracções com PM < 3kDa dos leites de ovelha fermentados com 0 dias de armazenamento.

Número de péptidos	Controlo	LCS-01	L26	BB12
9	x	x		
4	x		x	
11	x			x
2	x	x	x	
1	x		x	x
2		x	x	x
23		x	x	
3		x		x
4			x	x

Legenda: x: fracções em que os péptidos estão presentes; L26: *L. paracasei* LAFTI® L26; LCS-01: *L. casei-01*; BB12: *B. animalis* Bb-12

Nos leites de ovelha é interessante observar a distribuição do número de péptidos comuns que é apresentada na Tabela 12 onde são identificados o número de péptidos comuns a cada conjunto de fracções. As fracções com maior número de picos comuns são as fracções dos leites fermentados com lactobacilos, o que reflecte as observações feitas nos perfis de HPLC das fracções de leites de ovelha donde se destaca um pico comum a estas fracções que não surge nas fracções de leite fermentado com *B. animalis* Bb-12 ou no leite controlo. A outra observação possível entre os perfis de HPLC foi a semelhança dos perfis das fracções de leite fermentado com *B. animalis* Bb-12 e leite controlo, as quais apresentam 11 picos comuns identificados por MS, a segunda contagem de péptidos comuns mais elevada.

Comparando o número de picos encontrados por MS para as fracções dos leites de ovelha com os resultados de actividade antioxidante para as mesmas fracções não é possível associar um maior número de picos a uma determinação de capacidade antioxidante superior. Apesar disto, considerando só as fracções de leites de ovelha fermentados com estirpe, parece haver alguma relação directa entre o número de picos identificados e a actividade antioxidante determinada para estas fracções.

Duma maneira geral não é possível observar uma relação directa entre as contagens de picos e a actividade antioxidante determinada para as amostras analisadas. Em casos pontuais, nas fracções do leite de cabra e nas fracções dos leites de ovelha

fermentados com estirpe, é possível associar fracções com maior número de picos a fracções com maior actividade antioxidante, mas a julgar pelo cenário geral esta relação podem ser ocasional e não haver qualquer relação entre os dois resultados.

Na Figura 17 apresenta-se a distribuição dos picos identificados para as fracções analisadas por MS em função sua razão m/z. Pela análise desta figura pode observar-se perfis de distribuição muito semelhantes nas duas fracções dos leites de cabra, algumas semelhanças nas duas fracções dos leites de vaca e nas duas fracções dos leites de ovelha fermentados com os lactobacilos.

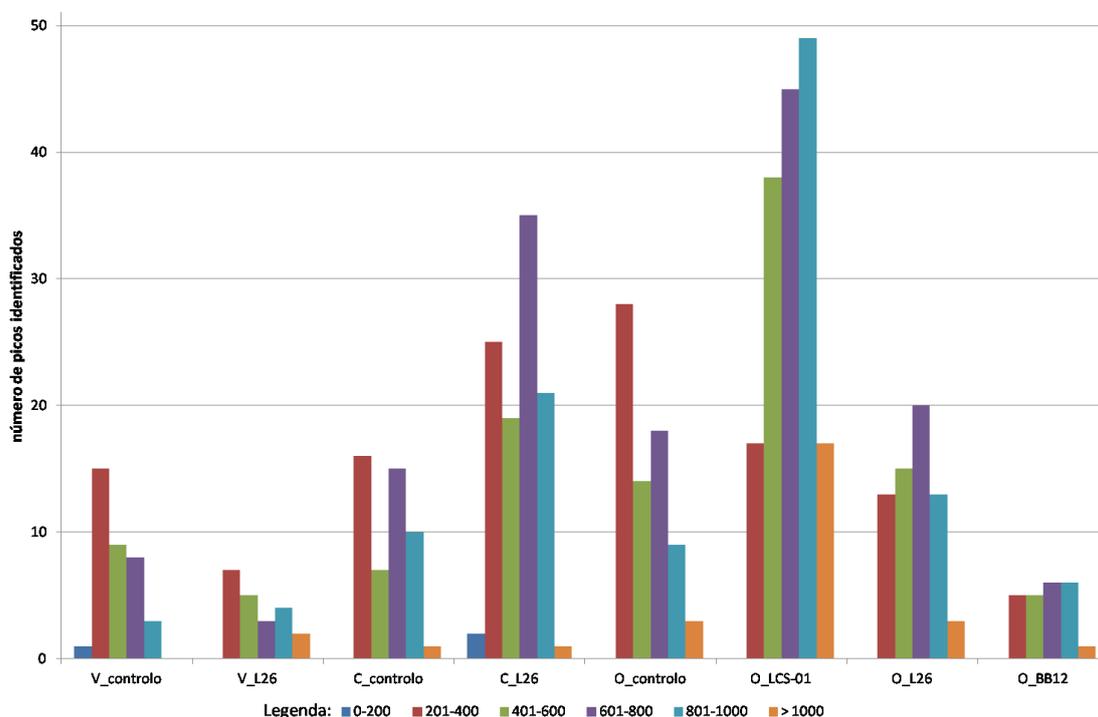


Figura 17 – Representação gráfica da distribuição dos picos identificados pela análise por MS em função da razão m/z. Cada barra representa um intervalo de m/z como se indica na legenda abaixo do gráfico. As classes identificadas devem ser interpretadas como as fracções com PM < 3kDa com origem nos leite fermentado na combinação apresentada no modelo “inicial da origem do leite_estirpe”. Na designação da estirpe utiliza-se a nomenclatura L26 para *L. paracasei* LAFTI® L26, LCS-01 para *L. casei-01* e BB12 para *B. animalis* Bb-12.

Por comparação dos perfis de distribuição dos picos identificados para as fracções analisadas por MS em função sua razão m/z (Figura 17) é possível observar alguma semelhança entre os perfis das fracções dos leites controlo dos pequenos ruminantes, sendo o perfil da fracção do leite de vaca menos semelhante. Comparando

ainda os perfis das fracções dos leites fermentados com *L. paracasei* LAFTI® L26 de todos os leites, observa-se que não existe grandes semelhanças entre os três perfis, podendo isto ser interpretado como um reflexo do diferente desempenho da mesma estirpe em três matrizes ligeiramente diferentes. Esta observação vem reforçar o interesse em estudar o potencial dos leites dos pequenos ruminantes ao nível do mercado emergente dos alimentos funcionais.

Ainda na Figura 17 é possível comparar o efeito das diferentes estirpes no leite de ovelha. Analisando os perfis das fracções dos leites de ovelha, destaca-se a semelhança entre as fracções de leites fermentados com lactobacilos cujos perfis não apresentam semelhanças com o perfil da fracção de leite de ovelha fermentado com *B. animalis* Bb-12. Esta observação das semelhanças entre os perfis das fracções de leites de ovelha fermentados com estirpe está de acordo e muito provavelmente está relacionada com a proximidade filogenética das três estirpes em estudo [133].

Foi tentada outra abordagem na análise dos resultados de MS, que não foi bem sucedida. Nesta abordagem procurou-se cruzar os dados da literatura, péptidos com sequências conhecidas independentemente das proteínas precursoras [103-104, 129, 134], com os dados experimentais. Embora esta abordagem não tenha sido feita de forma exaustiva, não foi possível identificar nenhum dos péptidos previamente descritos na literatura. Um dos maiores entraves a este tipo de abordagem prende-se com as características dos péptidos com actividade antioxidante, os quais vão mantendo uma sequência comum entre si, mas a sequência onde a fracção comum se encaixa depende muito das proteína precursora e do tipo de proteólise a que esta é sujeita. A título de exemplo Sabeena Farvin et al. [134] identifica um péptido com a sequência **GVRGPFPII** ao passo que Hernández-Ledesma et al. [129] num estudo anterior havia identificado o péptido com a sequência **GPVRGPFPII**. Estes péptidos, apesar de manterem a sequência comum identificada a negrito, diferem entre si no(s) aminoácido(s) que precede(m) esta sequência comum. Em última análise, estes péptidos tem massas moleculares diferentes o que torna impensável procurar péptidos com base na massa molecular calculada para estas sequências ou apenas para a sequência comum.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que o tipo de leite pode influenciar o crescimento da estirpe, como se verificou pelo número de células viáveis superiores nos leites fermentados produzidos a partir de leite de ovelha e também pelo número ligeiramente inferiores nos leites de cabra. Contudo, embora este factor influencie o crescimento da estirpe, o seu peso no resultado final do crescimento da estirpe não é significativo do ponto de vista de número mínimo de células viáveis para um produto probiótico.

Ainda ao nível do crescimento da estirpe, e também sem influencia negativa sobre o número de células viável mínimo exigido a um produto probiótico, observou-se um menor desempenho da *Bifidobacterium animalis* Bb-12 comparativamente às duas outras estirpes em estudo. Por consulta da informação disponível na literatura, que indica que esta é a estirpe com menos capacidade proteolítica, esperava-se que os números mais reduzidos de células viáveis se reflectissem numa menor extensão da proteólise avaliada pelo método de kjeldahl. Contudo nas quantificações de azoto esta estirpe surge como a mais proteolítica nas fracções de azoto solúvel dos leites fermentados de vaca e cabra, o que já não se verifica nas fracções de azoto não proteico destes leites e em qualquer fracção azotada dos leites de ovelha. No que diz respeito aos resultados relativos à extensão da proteólise em leites com *B. animalis* Bb-12, os resultados são pouco conclusivos.

Da avaliação da extensão da proteólise conclui-se nos leites de ovelha que as estirpes mais proteolíticas são as de lactobacilos quer ao nível dos valores superiores de fracção de azoto solúvel, quer na fracção de azoto não proteico. Enquanto para os leites de cabra e vaca os resultados são um pouco confusos devido à tendência já descrita para a *B. animalis* Bb-12.

Ao nível das actividades biológicas, apesar de a actividade anti-hipertensiva não ter sido determinada para todas as amostras, os resultados obtidos para um lote de amostras aleatórias indicou um fraco potencial dos leites fermentados produzidos neste estudo na obtenção de péptidos com capacidade de inibição da ECA.

Por sua vez os resultados obtidos para a determinação da actividade antioxidante dos péptidos foram positivos, sobretudo nos leites fermentados com as estirpes de

lactobacilos com 0 dias de armazenamento. Apesar dos resultados indicadores dum acréscimo de capacidade antioxidante por parte da fermentação bacteriana, o armazenamento parece ter um efeito negativo sobre a capacidade antioxidante dos leites fermentados. Considerando o único resultado disponível para esta actividade aos 14 dias de armazenamento e os dados da literatura já discutidos, perspectiva-se um aumento desta actividade nos primeiros 14 dias de armazenamento. De referir que este estudo não permite concluir acerca desta tendência durante o início do armazenamento e que as expectativas descritas são meramente especulativas, carecendo da análise dos leites fermentados preparados neste trabalho e amostrados ao tempo de armazenamento de 14 dias.

Neste sentido, conclui-se que os leites fermentados produzidos podem constituir um bom meio para identificar novos péptidos com actividade antioxidante, mas poderão não ser a melhor escolha para a produção de um produto probiótico com propriedades antioxidantes uma vez que esta capacidade antioxidante tende a diminuir para valores inferiores aos determinados para os leites sem estirpe probiótica ao fim de 28 dias de armazenamento. Outro senão observado nas determinações da actividade antioxidante está relacionado com os desvios observados entre réplicas biológicas, razão pela qual se sugere a repetição da produção destes leites fermentados, com maior número de réplicas biológicas e com especial atenção aos factores que poderão diminuir a actividade antioxidante durante a manipulação das amostras (exposição ao oxigénio, exposição à luz, entre outros).

Relativamente à valorização dos leites de ovelha e cabra, os resultados da capacidade antioxidante não valorizam por si só a utilização destes leites como produtores de péptidos antioxidantes pois, duma maneira geral, é no leite de vaca que se observa o maior potencial antioxidante. Contudo, se considerarmos o valor nutricional destes leites e o acréscimo de actividade antioxidante que o agente probiótico induz então o saldo para estes leites é positivo, em particular para o leite de ovelha. Este proporciona um leite com maior conteúdo em nutrientes, onde os microrganismos probióticos surgem com número de células viáveis superiores e produzem um acréscimo mais significativo à capacidade antioxidante nativa do leite.

Da análise por espectrometria de massa nada se pode concluir pois a análise realizada foi exploratória, apenas com o intuito de determinar a complexidade da

amostra, de forma a ser possível programar experiências posteriores e não permitindo a identificação de nenhum péptido ou conjunto de péptidos responsáveis pela maior capacidade antioxidante dos leites fermentados com as estirpes probióticas. Nesse sentido seria imperativo proceder a um fraccionamento por HPLC das fracções analisadas, voltar a determinar a capacidade antioxidante das novas fracções e tentar obter fracções equivalentes de controlo e leite fermentado com resultados nulos para a capacidade antioxidante dos controlos e com actividade antioxidante evidente na fracção dos leites fermentados com estirpe e proceder a uma análise por MS para determinar os péptidos únicos na fracção com actividade.

Dos resultados de espectrometria de massa, o dado mais relevante é a contagem do número de picos identificados para cada fracção analisada. Destes dados retira-se que as fracções analisadas são relativamente pouco complexas e que trabalhando em condições optimizadas para a separação destes péptidos por HPLC seria possível obter facilmente fracções com número de péptidos bastante reduzido e conseguir fazer a análise proposta no paragrafo anterior.

6. REFERÊNCIAS

1. Hui, Y.H., *Food Biochemistry and Food Processing*. 2006: Blackwell Publishing.
2. Park, Y.W., et al., *Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk*. *Small Ruminant Research*, 2007. **68**(1-2): p. 88-113.
3. Fox, P.F. and P.L.H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1998, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
4. Brown, A., *Understanding Food - Principles and preparation*. 3rd ed. 2007: Wadsworth Publishing Company.
5. Heller, K.J., *Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001. **73**(2): p. 374S-379S.
6. Nelson, D. and M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition*. 2004: {W. H. Freeman}.
7. Raynal-Ljutovac, K., et al., *Composition of goat and sheep milk products: An update*. *Small Ruminant Research*, 2008. **79**(1): p. 57-72.
8. Jandal, J.M., *Comparative aspects of goat and sheep milk*. *Small Ruminant Research*, 1996. **22**(2): p. 177-185.
9. Kandler, O., *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1983. **49**(3): p. 209-224.
10. Kim, B.H. and G.M. Gadd, *Bacterial Physiology and Metabolism*. 1st ed. 2008, New York: Cambridge University Press.
11. Law, B.A., *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. 1997, London; New York: Blackie Academic & Professional.
12. Fox, P.F., *Advanced dairy chemistry. 1, Proteins. Part A*. 2006, New York: Kluwer Academic.
13. Yalçın, A.S., *Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides*. *Current Pharmaceutical Design*, 2006. **12**(13): p. 1637-1643.
14. Michaelidou, A.M., *Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products*. *Small Ruminant Research*, 2008. **79**(1): p. 42-50.
15. Voet D., V.J.G., Pratt C. W., *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*: Wiley, New Jersey.
16. Erhardt, G., J. Godovac-Zimmermann, and A. Conti, *Isolation and complete primary sequence of a new ovine wild-type beta-lactoglobulin-C*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1989. **370**(7): p. 757-762.
17. Korhonen, H., et al., *Impact of processing on bioactive proteins and peptides*. *Trends in Food Science & Technology*, 1998. **9**(8-9): p. 307-319.
18. Meisel, H., *Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins*. *Current Medicinal Chemistry*, 2005. **12**(16): p. 1905-1919.
19. Korhonen, H., *Milk-derived bioactive peptides: From science to applications*. *Journal of Functional Foods*, 2009. **1**(2): p. 177-187.
20. Korhonen, H. and A. Pihlanto, *Technological Options for the Production of Health-Promoting Proteins and Peptides Derived from Milk and Colostrum*. *Current Pharmaceutical Design*, 2007. **13**(8): p. 829-843.
21. Chen, L., R.M. Daniel, and T. Coolbear, *Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders*. *International Dairy Journal*, 2003. **13**(4): p. 255-275.
22. Pirisi, A., A. Lauret, and J.P. Dubeuf, *Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality*. *Small Ruminant Research*, 2007. **68**(1-2): p. 167-178.
23. Barbosa, M., *Goats milk research in Portugal*. *Lait*, 1993. **73**(5-6): p. 425-429.
24. Slacanac, V., et al., *Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk*. *International Journal of Dairy Technology*, 2010. **63**(2): p. 171-189.

25. Freitas, A.C., A.C. Macedo, and F.X. Malcata, *Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks Revisión: Aspectos tecnológicos y sensoriales de quesos con denominación de origen elaborados en la Península Ibérica con leche de oveja y de cabra*. Food Science and Technology International, 2000. **6**(5): p. 351-370.
26. Boyazoglu, J. and P. Morand-Fehr, *Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality: A critical review*. Small Ruminant Research, 2001. **40**(1): p. 1-11.
27. Partidário, A.M., J.C.S. Ribeiro, and J.A.M. Prates, *Fatty acid composition and nutritional value of fat in three PDO ewe's milk Portuguese cheeses*. Dairy Science & Technology, 2008. **88**(6): p. 683-694.
28. Reis, P.J.M. and F.X. Malcata, *Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks*. Small Ruminant Research, (0).
29. Bettencourt, C.M. and L.F. Sobral, *Serpa Cheese production in Portugal*, in *Basis of the Quality of Typical Mediterranean Animal Products*, J.C. Flamant, D. Gabina, and M.E. Diaz, Editors. 1998, Wageningen Academic Publishers: Wageningen. p. 159-165.
30. El-Zahar, K., et al., *Peptic hydrolysis of ovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin - Exceptional susceptibility of native ovine beta-lactoglobulin to pepsinolysis*. International Dairy Journal, 2005. **15**(1): p. 17-27.
31. Buttriss, J., *Nutritional properties of fermented milk products*. International Journal of Dairy Technology, 1997. **50**(1): p. 21-27.
32. Gurr, M.I., *Nutritional aspects of fermented milk products*. FEMS Microbiology Letters, 1987. **46**(3): p. 337-342.
33. Livia, A., *Effect of Fermentation on Lactose, Glucose, and Galactose Content in Milk and Suitability of Fermented Milk Products for Lactose Intolerant Individuals*. Journal of Dairy Science, 1982. **65**(3): p. 346-352.
34. Savijoki, K., H. Ingmer, and P. Varmanen, *Proteolytic systems of lactic acid bacteria*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **71**(4): p. 394-406.
35. Gomes, A.M.P. and F.X. Malcata, *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*. Trends in Food Science & Technology, 1999. **10**(4-5): p. 139-157.
36. Donkor, O.N., et al., *Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage*. International Dairy Journal, 2007. **17**(6): p. 657-665.
37. Van der Meulen, R., et al., *In vitro kinetic analysis of carbohydrate and aromatic amino acid metabolism of different members of the human colon*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **124**(1): p. 27-33.
38. Saarela, M., et al., *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. Journal of Biotechnology, 2000. **84**(3): p. 197-215.
39. Ong, L., A. Henriksson, and N.P. Shah, *Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of Lactobacillus acidophilus, Lb. paracasei, Lb. casei or Bifidobacterium sp.* International Dairy Journal, 2007. **17**(1): p. 67-78.
40. Tannock, G.W., *Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D*. Trends in Biotechnology, 1997. **15**(7): p. 270-274.
41. Shihata, A. and N.P. Shah, *Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria*. International Dairy Journal, 2000. **10**(5-6): p. 401-408.
42. Christensen, J.E., et al., *Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 1999. **76**(1): p. 217-246.
43. Kunji, E.R.S., et al., *The proteolytic systems of lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 1996. **70**(2): p. 187-221.

44. López-Fandiño, R., J. Otte, and J. van Camp, *Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity*. International Dairy Journal, 2006. **16**(11): p. 1277-1293.
45. Holck, A. and H. NaeS, *Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NCDO 151*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(7): p. 1353-1364.
46. Nikolić, M., et al., *Variation in specificity of the PrtP extracellular proteinases in Lactococcus lactis and Lactobacillus paracasei subsp paracasei*. Folia Microbiologica, 2009. **54**(3): p. 188-194.
47. Liu, M., et al., *The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison*. BMC Genomics, 2010. **11**(36): p. 36.
48. Janer, C., et al., *Enzymatic Ability of Bifidobacterium animalis subsp. lactis To Hydrolyze Milk Proteins: Identification and Characterization of Endopeptidase O*. Appl. Environ. Microbiol., 2005. **71**(12): p. 8460-8465.
49. Macedo, A.C., et al., *Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese*. International Dairy Journal, 2000. **10**(11): p. 769-774.
50. González, L., et al., *Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese*. Food Microbiology, 2010. **27**(5): p. 592-597.
51. Bintsis, T., et al., *Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine*. Journal of Applied Microbiology, 2003. **95**(1): p. 68-77.
52. Donkor, O.N., et al., *Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk*. Lait, 2007. **87**(1): p. 21-38.
53. Moller, N.P., et al., *Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects*. European Journal of Nutrition, 2008. **47**(4): p. 171-182.
54. Andersson, H., et al., *Health effects of probiotics and prebiotics A literature review on human studies*. 2001. 2001.
55. FAO/WHO, *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. 2001, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: Córdoba, Argentina.
56. Granato, D., et al., *Probiotic Dairy Products as Functional Foods*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010. **9**(5): p. 455-470.
57. Minelli, E.B., et al., *Assessment of novel probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods*. International Dairy Journal, 2004. **14**(8): p. 723-736.
58. Shah, N.P., *Functional cultures and health benefits*. International Dairy Journal, 2007. **17**(11): p. 1262-1277.
59. Su, P., A. Henriksson, and H. Mitchell, *Survival and retention of the probiotic Lactobacillus casei LAFTI[®] L26 in the gastrointestinal tract of the mouse*. Letters in Applied Microbiology, 2007. **44**(2): p. 120-125.
60. Sanders, M.E., *Probiotics: Considerations for human health*. Nutrition Reviews, 2003. **61**(3): p. 91-99.
61. Rodrigues, D., et al., *The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices*. Lwt-Food Science and Technology, 2011. **44**(1): p. 100-108.
62. Matricardi, P.M., *Probiotics against allergy: data, doubts, and perspectives*. Allergy, 2002. **57**(3): p. 185-187.
63. Gonzalez, S.N., et al., *Biotherapeutic role of fermented milk*. Biotherapy, 1995. **8**(2): p. 129-134.

64. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid, *Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics*. Journal of Nutrition, 1995. **125**(6): p. 1401-1412.
65. Wang, Y., *Prebiotics: Present and future in food science and technology*. Food Research International, 2009. **42**(1): p. 8-12.
66. Gibson, G.R., et al., *Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics*. Nutrition Research Reviews, 2004. **17**(2): p. 259-275.
67. Paseephol, T. and F. Sherkat, *Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage*. Journal of Functional Foods, 2009. **1**(3): p. 311-318.
68. Su, P., A. Henriksson, and H. Mitchell, *Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro*. Anaerobe, 2007. **13**(3-4): p. 134-139.
69. Di Criscio, T., et al., *Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams*. Journal of Dairy Science, 2010. **93**(10): p. 4555-4564.
70. Cardarelli, H.R., et al., *Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese*. LWT - Food Science and Technology, 2008. **41**(6): p. 1037-1046.
71. Kitts, D.D. and K. Weiler, *Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**(16): p. 1309-1323.
72. Clare, D.A. and H.E. Swaisgood, *Bioactive Milk Peptides: A Prospectus*. Journal of Dairy Science, 2000. **83**(6): p. 1187-1195.
73. Yamamoto, N., M. Ejiri, and S. Mizuno, *Biogenic peptides and their potential use*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**(16): p. 1345-1355.
74. Korhonen, H. and A. Pihlanto, *Bioactive peptides: Production and functionality*. International Dairy Journal, 2006. **16**(9): p. 945-960.
75. Chobert, J.-M., et al., *Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine beta-lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters*. Lait, 2005. **85**(3): p. 141-152.
76. Gobbetti, M., et al., *Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp. cremoris FT4*. Appl. Environ. Microbiol., 2000. **66**(9): p. 3898-3904.
77. Kapila, S., et al., *Augmentation of biofunctional properties of whey protein on fermentation with Lactobacillus helveticus*. Milchwissenschaft-Milk Science International, 2009. **64**(3): p. 245-249.
78. Minervini, F., et al., *Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food*. Food Microbiology, 2009. **26**(6): p. 559-564.
79. Nakamura, Y., et al., *Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk*. Journal of Dairy Science, 1995. **78**(4): p. 777-783.
80. Nielsen, M.S., et al., *Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time*. International Dairy Journal, 2009. **19**(3): p. 155-165.
81. Pihlanto, A., T. Virtanen, and H. Korhonen, *Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk*. International Dairy Journal, 2010. **20**(1): p. 3-10.
82. Quirós, A., et al., *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir*. Journal of Dairy Science, 2005. **88**(10): p. 3480-3487.
83. Sun, T.S., et al., *ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by Lactobacillus helveticus isolated from Xinjiang koumiss in China*. European Food Research and Technology, 2009. **228**(4): p. 607-612.

84. Tellez, A., et al., *Characterization of immune-active peptides obtained from milk fermented by Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Research, 2010. **77**(2): p. 129-136.
85. Quirós, A., et al., *Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with Enterococcus faecalis*. International Dairy Journal, 2007. **17**(1): p. 33-41.
86. Ramchandran, L. and N.P. Shah, *Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and alpha-glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria*. Journal of Food Science, 2008. **73**(2): p. M75-M81.
87. Ramchandran, L. and N.P. Shah, *Effect of addition of Versagel (R) on microbial, chemical, and physical properties of low-fat yogurt*. Journal of Food Science, 2008. **73**(7): p. M360-M367.
88. Chaneton, L., J.M.P. Saez, and L.E. Bussmann, *Antimicrobial activity of bovine beta-lactoglobulin against mastitis-causing bacteria*. Journal of Dairy Science, 2011. **94**(1): p. 138-145.
89. Pescuma, M., et al., *Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content*. Food Microbiology, 2008. **25**(3): p. 442-451.
90. Pescuma, M., et al., *Hydrolysis of whey proteins by Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus grown in a chemically defined medium*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **103**(5): p. 1738-1746.
91. Schagger, H., *Tricine-SDS-PAGE*. Nat. Protocols, 2006. **1**(1): p. 16-22.
92. Church, F.C., et al., *Spectrophotometric assay using ortho-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk-proteins*. Journal of Dairy Science, 1983. **66**(6): p. 1219-1227.
93. Moore, J.C., et al., *Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010. **9**(4): p. 330-357.
94. Irvin, J.D. and J.M. Viau, *Safety profiles of the angiotensin converting enzyme inhibitors captopril and enalapril*. The American Journal of Medicine, 1986. **81**(4, Supplement 3): p. 46-50.
95. Cushman, D.W. and H.S. Cheung, *Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung*. Biochemical Pharmacology, 1971. **20**(7): p. 1637-1648.
96. Holmquist, B., P. Bünning, and J.F. Riordan, *A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme*. Analytical Biochemistry, 1979. **95**(2): p. 540-548.
97. Sentandreu, M.A. and F. Toldrá, *A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme*. Food Chemistry, 2006. **97**(3): p. 546-554.
98. Quirós, A., et al., *Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties*. Peptides, 2009. **30**(10): p. 1848-1853.
99. Hernández-Ledesma, B., et al., *Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion*. Journal of Chromatography A, 2004. **1049**(1-2): p. 107-114.
100. Hata, Y., et al., *A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1996. **64**(5): p. 767-771.
101. Seppo, L., et al., *The effect of a Lactobacillus helveticus LBK-16 H fermented milk on hypertension - a pilot study on humans*. Milchwissenschaft-Milk Science International, 2002. **57**(3): p. 124-127.

102. Hartmann, R. and H. Meisel, *Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(2): p. 163-169.
103. Sarmadi, B.H. and A. Ismail, *Antioxidative peptides from food proteins: A review*. Peptides, 2010. **31**(10): p. 1949-1956.
104. Pihlanto, A., *Antioxidative peptides derived from milk proteins*. International Dairy Journal, 2006. **16**(11): p. 1306-1314.
105. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
106. Zulueta, A., M.J. Esteve, and A. Frigola, *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products*. Food Chemistry, 2009. **114**(1): p. 310-316.
107. MacDonald-Wicks, L.K., L.G. Wood, and M.L. Garg, *Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. **86**(13): p. 2046-2056.
108. Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, *Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(10): p. 4619-4626.
109. Gião, M.S., et al., *Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007. **87**(14): p. 2638-2647.
110. Minkiewicz, P., et al., *Food peptidomics*. Food Technology and Biotechnology, 2008. **46**(1): p. 1-10.
111. Cortez, M.A.S., et al., *Effect of pH on Characteristics of Low-Moisture Mozzarella Cheese during Refrigerated Storage*. Journal of Food Science, 2008. **73**(9): p. S443-S448.
112. Gupta, A., et al., *Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening*. International Journal of Dairy Technology, 2009. **62**(3): p. 339-347.
113. Papadimitriou, C.G., et al., *Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity*. Food Chemistry, 2007. **105**(2): p. 647-656.
114. Singh, T.K., et al., *Production and sensory characterization of a bitter peptide from beta-casein*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(4): p. 1185-1189.
115. Bazinet, L. and L. Firdaous, *Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides*. Recent Pat Biotechnol, 2009. **3**(1): p. 61-72.
116. Kuchroo, C.N. and P.F. Fox, *SOLUBLE NITROGEN IN CHEDDAR CHEESE - COMPARISON OF EXTRACTION PROCEDURES*. Milchwissenschaft-Milk Science International, 1982. **37**(6): p. 331-335.
117. Kuchroo, C.N. and P.F. Fox, *FRACTIONATION OF THE WATER-SOLUBLE NITROGEN FROM CHEDDAR CHEESE - CHEMICAL METHODS*. Milchwissenschaft-Milk Science International, 1982. **37**(11): p. 651-653.
118. O'Donnell, R., et al., *Milk proteomics*. International Dairy Journal, 2004. **14**(12): p. 1013-1023.
119. Shi, Y., et al., *The role of liquid chromatography in proteomics*. Journal of Chromatography A, 2004. **1053**(1-2): p. 27-36.
120. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**: p. 437-473.
121. El-Aneed, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*. Applied Spectroscopy Reviews, 2009. **44**(3): p. 210-230.

122. Kussmann, M., et al., *Mass Spectrometry in nutrition: Understanding dietary health effects at the molecular level*. Mass Spectrometry Reviews, 2007. **26**(6): p. 727-750.
123. Atanasova, J. and I. Ivanova, *Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2010. **24**(2): p. 1799-1803.
124. Fitzgerald, R.J. and B.A. Murray, *Bioactive peptides and lactic fermentations*. International Journal of Dairy Technology, 2006. **59**(2): p. 118-125.
125. Ashar, M.N. and R. Chang, *Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects*. Milchwissenschaft-Milk Science International, 2004. **59**(7-8): p. 363-366.
126. Gobetti, M., R. Di Cagno, and M. De Angelis, *Functional Microorganisms for Functional Food Quality*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010. **50**(8): p. 716-727.
127. Lynch, J.M. and D.M. Barbano, *Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products*. Journal of Aoac International, 1999. **82**(6): p. 1389-1398.
128. Sharma, S.K. and M. Le Maguer, *Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions*. Food Research International, 1996. **29**(3-4): p. 309-315.
129. Hernández-Ledesma, B., et al., *Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(6): p. 1041-1048.
130. Amirdivani, S. and A.S. Baba, *Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil*. LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(6): p. 1458-1464.
131. Sabeena Farvin, K.H., et al., *Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω -3 enriched milk*. Food Chemistry, 2010. **123**(4): p. 1081-1089.
132. Mota, M.V.T., et al., *Enzymatic Hydrolysis of Whey Protein Concentrates: Peptide HPLC Profiles*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2004. **27**(16): p. 2625-2639.
133. Holzapfel, W.H., et al., *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. American Journal of Clinical Nutrition, 2001. **73**(2): p. 365s-373s.
134. Sabeena Farvin, K.H., et al., *Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions*. Food Chemistry, 2010. **123**(4): p. 1090-1097.