



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

BLEND A BRITO DE QUEIROZ

**AVALIAÇÃO ELETROFORÉTICA EM PRODUTOS LÁCTEOS COM A ADIÇÃO
DE SORO DE QUEIJO E CULTURA COMERCIAL POTENCIALMENTE
PROBIÓTICA DE *LACTOBACILLUS CASEI***

**CAMPINA GRANDE
2018**

BLEND A BRITO DE QUEIROZ

Avaliação eletroforética em produtos lácteos com a adição de soro de queijo e cultura comercial potencialmente probiótica de *Lactobacillus casei*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti

CAMPINA GRANDE – PB
2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

Q38a Queiroz, Blenda Brito de.
Avaliação eletroforética em produtos lácteos com a adição de soro de queijo e cultura comercial potencialmente probiótica de *Lactobacillus casei* [manuscrito] : / Blenda Brito de Queiroz. - 2018.
38 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Soro lácteo. 2. Alimento probiótico. 3. Eletroforese.

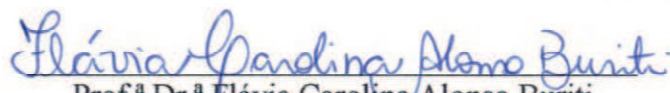
21. ed. CDD 615.34

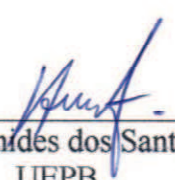
BLEND A BRITO DE QUEIROZ


Avaliação eletroforética em produtos lácteos com a adição de soro de queijo e cultura comercial potencialmente probiótica de *Lactobacillus casei*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 12/06/2018.


Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti
UEPB
Orientadora


Prof. Dr. Heronides dos Santos Pereira
UEPB
Examinador Interno


Prof.^a Michelângela Suelleny de Caldas Nobre
Faculdades Integradas de Patos
Examinadora Externa

Aos meus pais, por todo apoio e
amor dedicados a mim.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo seu amor e por ter me dado forças a todo momento.

À minha família, principalmente à minha mãe Socorro, ao meu pai Eleomá e à minha irmã Bárbara por estarem ao lado todos os dias me incentivando e apoiando na caminhada da graduação.

À minha avó Maria da Luz (*in memoriam*) por me escutar estudar nos domingos e me apoiar a vida inteira. Aos meus familiares, tias, madrinha, pelas ausências nas reuniões de família. À minha avó Francisca por mesmo de longe apoiar e torcer pelo meu futuro.

À minha orientadora Flávia Carolina Alonso Buriti, pelos anos de ensinamentos, dedicação e apoio.

Aos técnicos de laboratório do NUPEA; Thiago dos Santos, Adna Bandeira e Adriana Arruda, por dias, tardes e noites de compreensão, apoio e amizade.

À minha turma 2013.1, principalmente a Daniely Farias, Alisson Sousa, Mariana Dantas, Messias Gomes, Pablo Rayff, Joyce Correia, Geovana Guedes, Lucas Linhares, Raiff Santos, Rafael Feijó, Luís Martins, Silmara Vicentini, por tornar nossas cargas menos pesadas com tanto companheirismo e carinho entre nós.

Às Empresas DuPont/Danisco Brasil Ltda. e Embrapa Caprinos e Ovinos por parte dos materiais cedidos à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (PROPESQ/UEPB) pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos Professores do Departamento de Farmácia por serem tão dedicados a nos tornar bons profissionais, ministrando as suas aulas com amor e carinho à profissão.

RESUMO

Os soros lácteos caprino e bovino são considerados coprodutos da fabricação queijeira que, por vezes, são descartados sem tratamento algum, tornando-se fontes de poluição. A utilização desse soro para a produção de bebidas lácteas tem sido proposta devido ao seu valor nutricional. Culturas probióticas são constituídas de microrganismos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, melhorando seu trânsito intestinal, podendo assim ser usadas em bebidas fermentadas. Várias proteínas de alimentos contêm frações denominadas peptídeos bioativos que são benéficas à saúde humana. Este trabalho teve como objetivo avaliar as frações proteicas de produtos e bebidas lácteas com o uso de soro de leite de cabra ou de vaca com adição de leite em pó e jambolão (*Syzygium cumini*), todos contendo a cultura potencialmente probiótica de *Lactobacilos casei* BGP93. Foram analisadas amostras de: soro fluido caprino *in natura* (SF); soro caprino reconstituído sem a adição das culturas (SR); soro caprino reconstituído com a adição das culturas antes do início da fermentação (STI), ao final da fermentação (STF), e após 1 e 7 dias 4°C (SD1 e SD7, respectivamente); bebidas lácteas caprinas adoçadas após 1, 7, 14, 21 dias de armazenamento a 4° C (CD1, CD7, CD14, CD21 respectivamente); base láctea sem lactose antes do início da fermentação (BTI) e ao final da fermentação (BTF); bebida láctea sem lactose com jambolão após 1, 7, 14, 21 dias de armazenamento à 4° C (JD1, JD7, JD14, JD21 respectivamente). Todos os produtos fermentados foram adicionados da cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* TA40. Os produtos lácteos foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para a avaliação da degradação proteica nas amostras durante o processamento e armazenamento. Nos produtos de soro de cabra, as principais proteínas identificadas foram α -lactalbumina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg) imunoglobulina G (IgG), soroalbumina (SA) e lactoferrina (LF). A adição de açúcar não afetou o perfil proteico nas amostras caprinas. No produto lácteo com jambolão foram identificadas as proteínas do leite β -caseína (β -Cs), α 1-caseína (α 1-Cs) e α 2-caseína (α 2-Cs), além das proteínas do soro α -La, β -Lg, IgG, SA e LF. Foram verificadas diferenças quanto aos perfis revelados pelas técnicas de Coomassie Blue e de nitrato de prata. No entanto, apenas pela técnica de nitrato de prata foi possível verificar as frações de peptídeos menores que a α -La liberados durante a elaboração dos produtos. Dessa forma, a técnica de Coomassie Blue foi interessante para avaliar as amostras contendo leite e, portanto, caseína, revelando melhor as proteínas em maior concentração nos produtos. Por outro lado, a técnica de nitrato de prata é a mais indicada para a revelação das frações de menor massa molar.

Palavras-Chave: Soro lácteo. Alimentos probióticos. Análise eletroforética.

ABSTRACT

Caprine and bovine whey are considered coproducts in cheese production that, sometimes, are discarded without any treatment, becoming source of pollution. Utilization of that whey in dairy drinks production has been proposed due to its high nutritional value. Probiotic cultures are composed by microorganisms that offer benefits to their host health, improving intestinal traffic, and can thus be used in fermented drinks. Many food proteins have fractions named bioactive peptides that are benefic to human health. This work had as its objective to evaluate protein fractions of products and dairy drinks using goat or cow whey with addition of powdered milk and jambolan (*Syzygium cumini*), all containing a potentially probiotic culture of *Lactobacilos casei* BGP93. It was analyzed samples of: in natura caprine whey fluid (SF), reconstituted caprine whey without culture addition (SR); reconstituted caprine whey with culture addition before starting fermentation (STI), by the end of fermentation (STF), and after 1 and 7 days 4 °C (SD1 and SD7, respectively); sweetened caprine dairy drinks after 1, 7, 14, 21 days of storage in 4 °C (CD1, CD7, CD14, CD21 respectively); dairy base without lactose with jambolan after 1, 7, 14, 21 days of storage in 4 °C (JD1, JD7, JD14, JD21 respectively). All fermented products were added from a starter culture of *Streptococcus thermophilus* TA40. The dairy products were submitted to the technique of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to evaluate protein degradation in the samples during processing and storage. In goat whey products, the main proteins identified were α -lactalbumin (α -La), β -lactoglobulin (β -Lg) immunoglobulin G (IgG), serum albumin (SA) e lactoferrin (LF). Addition of sugar did not affect the protein profile in caprine samples. In jambolan dairy product were identified the milk proteins β -casein (β -Cs), α s1-casein (α s1-Cs) and α s2-casein (α s2-Cs), besides the whey proteins α -La, β -Lg, IgG, SA and LF. It was verified differences in the profiles exposed by the Coomassie Blue and silver nitrate techniques. However, only by the silver nitrate technique it was possible to verify the fractions of smaller peptides than the α -La released during the elaboration of the products. Thus, the Coomassie Blue was interesting to evaluate the samples containing milk and, therefore casein, better exposing the proteins in higher concentration in the products. On the other hand, silver nitrate technique is more suitable for the exposure of fractions with low molar mass.

Keywords: Whey. Probiotic food. Electrophoretic analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE 17,5% em soro de queijo de cabra.....	23
Figura 2	Análise densitométrica, gerada pelo programa GelAnalyzer, em soro de queijo de cabra.....	25
Figura 3	Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE 17,5% em soro de queijo de cabra adoçado.....	27
Figura 4	Análise densitométrica, gerada pelo programa GelAnalyzer, em soro de queijo de cabra adoçado.....	28
Figura 5	Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 15%, das proteínas, coradas com Coomassie Blue, presentes nas bases lácteas sem lactose.....	29
Figura 6	Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 15%, das proteínas, coradas com nitrato de prata, presentes nas bases lácteas sem lactose.....	30
Figura 7	Análise densitométrica gerada pelo programa GelAnalyzer, das bandas das proteínas obtidas por SDS-PAGE, gel 15%, coradas com Coomassie Blue, nas amostras de base láctea sem lactose.....	32
Figura 8	Análise densitométrica gerada pelo programa GelAnalyzer, das bandas das proteínas obtidas por SDS-PAGE, gel 15%, coradas com nitrato de prata, nas amostras de base láctea sem lactose.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
2	OBJETIVO	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivo específico.....	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	Alimentos funcionais.....	12
3.2	Probióticos.....	12
3.3	Peptídeos bioativos.....	13
3.4	Soro e leite caprino e bovino.....	14
3.5	Bebidas lácteas e adição de frutas.....	15
3.6	Eletroforese em gel SDS-PAGE.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Matérias primas.....	17
4.2	Preparo dos produtos lácteos de soro em pó de queijo de cabra.....	17
4.2.1	<i>Obtenção do soro de queijo</i>	17
4.2.2	<i>Secagem do soro por atomização</i>	17
4.2.3	<i>Produto lácteo sem açúcar</i>	17
4.2.4	<i>Produto lácteo adoçado</i>	18
4.3	Preparo da bebida láctea com jambolão.....	18
4.3.1	<i>Obtenção dos frutos de jambolão</i>	18
4.3.2	<i>Obtenção do soro de queijo para a elaboração da bebida láctea com jambolão...</i>	18
4.3.3	<i>Preparo da base láctea</i>	18
4.3.4	<i>Etapas de fermentação e adição das culturas</i>	19
4.4	Períodos de amostragem.....	19
4.5	Análise proteolítica.....	19
5	Resultados e discussões	22
5.1	Avaliação dos produtos lácteos caprinos.....	22
5.2	Avaliação da bebida láctea sem lactose com jambolão.....	29
6	Conclusão	34
	Referência.....	35

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as indústrias têm se preocupado com o desperdício de alimentos e com a poluição gerada através destes. O soro lácteo é o produto líquido obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou caseinatos. Ele representa 80 a 90% do volume de leite destinado à produção de queijo. Portanto, em sua composição existe boa quantidade de excelentes nutrientes como lactose e proteínas de elevado valor biológico (OLIVEIRA, 2006).

O soro lácteo caprino também tem benefícios para a nutrição de crianças e idosos, além de poder ser consumido sem efeitos negativos por pessoas que sofrem de alergia às proteínas do leite de vaca devido a menor alergenicidade (HASSAN et al., 2014). O uso do soro de cabra é uma tendência para a alimentação saudável, devido a ser rico em propriedades nutricionais com elevados teores de vitamina A, cálcio, fósforo, potássio, magnésio e proteínas de alto valor nutritivo. Também possui glóbulos de gorduras menores que o leite bovino, o que caracteriza uma melhor digestibilidade, justificando, dessa forma, o crescente estudo e desenvolvimento de produtos com seu uso (YANGILAR, 2013).

A bebida láctea é o produto resultante da mistura de leite e soro lácteo, adicionada ou não de produtos ou substâncias alimentícias, gordura vegetal, leites fermentados, fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. Ela é caracterizada como bebida láctea fermentada quando a mistura de leite e soro é fermentada mediante ação de cultivo de microrganismos específicos (ALMEIDA et al., 2001).

A produção de bebidas lácteas com soro caprino e bovino, com o uso de culturas probióticas apresenta-se viável, devido ao soro lácteo ser um meio considerado adequado para incorporação de microrganismos e pelos efeitos positivos que causam no organismo humano devido a presença de vitaminas hidrossolúveis, sais minerais e proteínas importantes para o bom funcionamento do corpo, além da lactose. O soro contém quase a metade dos nutrientes originais do leite. As proteínas do soro são complexas misturas de numerosas moléculas, cujas principais são β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas e albumina sérica que representam aproximadamente 2,7 g/L, 1,2 g/L, 0,65 g/L e 0,25 g/L, respectivamente (NOBRE, 2015). Especificamente, os benefícios do uso do soro de caprino são devido a sua rica composição nutricional, baixa alergenicidade e boa incorporação de microrganismos na produção de bebidas lácteas (HASSAN et al., 2014).

Do mesmo modo, a adição de polpa do jambolão (*Syzygium cumini*), que é rica em compostos fenólicos (como o ácido elágico) e flavonoides (como a quercetina, rutina e

antocianinas, os últimos sendo corantes naturais), poderá agregar valor nutricional a bebidas lácteas, fornecendo um alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O jambolão (*Syzygium cumini*, *Syzygium jambolanum*) é uma planta da família das Myrtaceae, tem origem na Ásia tropical, especificamente na Índia, contendo como metabólito secundário os terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. No jambolão destacam-se as antocianinas delfinidina-3-glicosídeo, a petunidina-3-glicosídeo e a malvidina-3-glicosídeo (LIMA et al., 2007; MIGLIATO et al., 2005; REYNERTSON et al., 2008).

Do mesmo modo que os produtos lácteos com o uso do soro de leite de cabra são benéficos a saúde o uso do leite bovino para a produção de bebidas lácteas também é viável, devido ao seu alto valor nutricional, embora apresente maior alergenicidade, podendo assim atender os requisitos de um produto funcional e nutritivo. (HASSAN et al., 2014).

Considerando a atividade de lactobacilos com potencial probiótico sobre as proteínas dos produtos lácteos, o estudo proteolítico pode ser realizado em sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a partir da migração de moléculas carregadas eletricamente onde estas estão dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual passa uma corrente elétrica. É uma técnica relativamente simples e com alta seletividade. Consiste na separação de moléculas (proteínas, ácido desoxirribonucleico-DNA e ácido ribonucleico-RNA) carregadas em um determinado meio sobre a influência de uma diferença de potencial. Dessa forma, as moléculas são separadas de acordo com o tamanho, as de menores massas molares migram primeiro do que as de maiores massas molares. A presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) no gel de poliacrilamida assegura uma condição desnaturante às proteínas (BOSSU, 2009).

O intuito dessa pesquisa é mostrar opções para diminuir o desperdício de soro lácteo pela produção de bebidas lácteas com alto valor nutricional que resultaria em benefícios ao meio ambiente, além de realizar a avaliação de seu perfil proteico por SDS-PAGE. A presença de probióticos viáveis com potencial proteolítico resultaria em benefícios adicionais à saúde através do aumento das chances de obtenção de peptídios bioativos, aumentando o valor funcional de produtos com soro de queijo caprino, bovino e jambolão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a análise proteolítica de três diferentes formulações de bebidas lácteas, todas contendo *Lactobacillus casei* BGP93, sendo duas produzidas com soro de queijo caprino e uma com leite, soro de queijo e polpa de jambolão (*Syzygium cumini*).

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos do projeto:

- a) analisar a presença de proteínas específicas através do sistema SDS PAGE;
- b) comparar o efeito dos diferentes ingredientes utilizados na elaboração dos produtos sobre o perfil proteico obtido;
- c) comparar as técnicas de revelação por Coomassie Brilliant Blue e por nitrato de prata para o tratamento com leite, soro de queijo e jambolão.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Alimentos funcionais

A população tem cada vez mais se preocupado com uma boa alimentação para adquirir benefícios e conseqüentemente uma melhora nas condições de saúde, assim como é crescente a preocupação com o desperdício de alimentos e a poluição do meio ambiente. Com isto, tem-se aumentado a procura e o consumo de alimentos que atendam a esses critérios de fabricação e benefícios. O alimento funcional, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela resolução n.º 18 de 30/04/1999, é definido como “todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

Os funcionais podem ser definidos também como alimentos, ou parte deles, que oferecem benefícios para a prevenção de doenças, bem como influenciam os parâmetros metabólicos combatendo as doenças crônicas, como as cardiovasculares e, por essas razões, vem sendo alvo crescente no mercado mundial (GIANEZINE et al., 2012; MANTHOU et al., 2014). Devendo-se levar em conta que esses alimentos tem o potencial de promover a saúde por mecanismos não previstos na nutrição convencional, restringindo seus efeitos à promoção da saúde e não a cura e doenças (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

3.2 Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro. Para que se tenha o efeito desejado a saúde, estes têm que sobreviver através das barreiras gastrointestinais em número suficiente. Portanto, as bactérias para serem selecionadas como probióticos, devem seguir como base alguns critérios tais como: o gênero, a origem, a estabilidade frente ao ácido estomacal e sais biliares, a capacidade de aderir a mucosa intestinal, a capacidade de se multiplicar, colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e a capacidade de exercer atividade metabólica no intestino (CASAROTTI; PENNA, 2015; RAIZEL et al., 2011; RANADHEERA et al., 2014).

A ingestão de probióticos pode afetar a diversidade e a composição da microbiota intestinal e ter efeitos benéficos sobre a saúde humana. Para garantir efeito contínuo no organismo, estes devem ser ingeridos diariamente (DEMERES-MATHIEU et al., 2015; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Vários benefícios à saúde têm sido atribuídos a cepas de *Lactobacillus* spp., as quais têm recebido grande atenção como microrganismos probióticos (VARGA; SÜLE; NAGYT 2014). Por exemplo, linhagens de lactobacilos isoladas de leite de cabra argeliana foram caracterizadas como microrganismos com potencial industrial, no tocante à utilização em derivados lácteos como culturas adjuntas. Ao se tratar da cepa de *Lactobacillus casei*, esta mostrou-se viável quando em bebidas lácteas, sendo mantida mesmo após 12 semanas de vida de prateleira (DAVIS, 2012).

3.3 Peptídeos bioativos

Os produtos lácteos constituem o principal veículo para a adição de microrganismos probióticos. Tem sido relatado, em função disso, os benefícios à saúde que o consumo de iogurtes, bebidas lácteas, queijos e sorvetes contendo probióticos podem trazer às pessoas que ingerem estes produtos (GRANATO et al., 2010). Alguns efeitos são mostrados por alguns autores como: regulação da microbiota, melhoria do trânsito intestinal, estimulação e desenvolvimento do sistema imunológico, redução de doenças cardiovasculares, inibição da enzima conversora de angiotensina (*angiotensin converting enzyme*, ACE), redução de sintomas de intolerância à lactose, entre outros (CASAROTTI; PENNA, 2015; DONKOR et al., 2007; RANADHEERA et al., 2014).

As proteínas do leite, assim como um grande número de outras proteínas alimentares, contêm sequências de aminoácidos que, quando libertadas como peptídeos por hidrólise enzimática ou fermentação, exercem efeito fisiológico benéfico (GOBBA et al., 2014). As proteínas naturais do leite, em especial β -caseína (β -Cs) e α 1-caseína (α 1-Cs), e as proteínas do soro, como β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbumina (α -La), imunoglobulinas (Ig), lactoperoxidase, lisozima e lactoferrina (LF), incluindo glicomacropéptídeos encontrados no soro de queijos de coagulação enzimática, vêm sendo reconhecidas como fonte de peptídeos bioativos quando digeridas por enzimas (ALMAAS et al., 2011; RAIKOS; DASSIOS, 2014). Tais peptídeos bioativos podem afetar o sistema cardiovascular, exercendo efeitos antitrombóticos, anti-hipertensivos, opioides, antioxidantes, imunomoduladores entre outros. Peptídeos bioativos foram identificados principalmente a partir de leite de vaca, mas as proteínas do leite de cabra também podem fornecer peptídeos com atividades antioxidante, antibacteriana, imunomoduladora e de inibição da ACE (ESPEJO-CARPIO et al., 2013; GOBBA et al., 2014).

Os peptídeos bioativos são definidos como componentes derivados das proteínas dos alimentos que, em complemento ao seu valor nutricional, exercem um efeito fisiológico ao organismo. Esses peptídeos são inativos quando íntegros dentro da sequência de aminoácidos da proteína principal e precisam ser liberados para exercer algum efeito (GOMES, 2012; RYAN et al., 2011). Estes podem ser formados a partir de vários métodos incluindo a fermentação microbiana com culturas vivas, hidrólise e proteólise enzimática utilizando enzimas de origem fúngica, bacteriana ou vegetal (KENT et al., 2012).

3.4 Soro e leite caprino e bovino

Segundo a legislação nacional vigente:

“[...] entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda” (BRASIL, 2011).

O leite contém em sua composição água, proteína, gordura, lactose e minerais (GOMES, 2012). O leite de cabra possui fácil digestibilidade quando comparado ao leite de vaca, tendo um maior valor terapêutico (HAENLEIN, 2004). Estas propriedades metabólicas estão sendo valorizadas e recomendadas, recentemente, por nutricionistas e pediatras para o consumo humano em diferentes faixas etárias (MARLETTA et al., 2004).

O uso de leite e/ou soro de queijo com propriedades nutricionais particulares, como o de cabra, puro ou em combinação com cepas bacterianas com propriedades probióticas e/ou produtoras de metabólitos fisiologicamente ativos, representa uma das opções tecnológicas para a produção de novos alimentos funcionais (MINERVINI et al., 2009; BURITI et al., 2014). A composição nutricional do soro de leite, especificamente o seu teor de proteínas, possui alta qualidade nutritiva com efeitos positivos sobre a saúde humana. No entanto, o soro gerado durante a produção industrial de queijo ainda é uma fonte importante de contaminação ambiental quando descartado sem tratamento. Por exemplo, durante a produção de queijo de cabra tipo 'coalho' cerca de 9 litros de soro são gerados para cada quilo de queijo produzido. Dessa forma, o uso do soro de queijos para produção de produtos lácteos, inclusive no Brasil, implica um destino mais racional deste subproduto industrial, com um impacto benéfico ao ambiente. Além disso, a utilização de soro de queijo para a produção de bebidas lácteas tem sido uma opção altamente atraente, por ser o soro de leite um substrato interessante para veicular bactérias probióticas (BORBA et al. 2014; BURITI et al., 2014).

A proteína presente no leite bovino caseína tem como função biológica transportar cálcio, fosfato e proteína, para os neonatos, compreendem cerca de 80% das proteínas do leite e consistem de quatro proteínas principais: α 1-, α 2-, β - e κ - caseína, representando cerca de 38%, 10%, 35% e 15%, respectivamente, as quais são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, com pesos moleculares de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente e 8% de fosfato de cálcio coloidal aproximadamente. A caseína tem atividade anfipática por possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. A conformação das moléculas expõe consideravelmente os resíduos hidrofóbicos, o que resulta em forte associação entre as caseínas e as tornam insolúveis em água (BRASIL et al, 2015). Cerca de 95% das caseínas no leite estão presentes na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas, que são as responsáveis pela estabilidade térmica do leite (BRASIL et al, 2015; FOX; BRODKORB, 2008). Por isso seu aparecimento evidente no produto com o uso de leite de vaca.

3.5 Bebidas lácteas e adição de frutas

De acordo com a legislação brasileira, bebidas lácteas possuem como definição:

[...] produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substâncias(s) alimentícias(s), gordura vegetal, leite(s) fermentados(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos, onde a base láctea representa menos de 51% massa/massa do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005).

No caso específico das bebidas lácteas fermentadas a contagem total de bactérias lácteas viáveis deve ser no mínimo, de 10^6 UFC/g no produto final para o cultivo láctico específico empregado durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

Em produtos lácteos, a adição de polpas de frutas é considerada como a melhor alternativa quando comparada a utilização de aromas artificiais, pois essa iniciativa contribui para uma melhor aceitação do produto, além de agregar valor nutricional devido à riqueza de nutrientes. Também é viável do ponto de vista econômico, dado o menor gasto na tecnologia de fabricação, sendo estes fatores primordiais para a obtenção de um produto com sabor agradável (GOMES, 2012).

O jambolão (*Syzygium cumini*, *Syzygium jambolanum*) é uma planta da família das Myrtaceae, que tem origem na Ásia tropical, especificamente na Índia. No Brasil floresce nos meses de setembro a novembro e o seu fruto é encontrado abundantemente nos meses de

dezembro a fevereiro. Os frutos, que são do tipo drupa, se assemelham bastante às azeitonas, a sua coloração, inicialmente branca, torna-se vermelha e posteriormente preta, quando maduros. O fruto possui uma única semente, envolvido por uma polpa carnosa e comestível, mucilaginoso, doce, sendo geralmente agradáveis ao paladar. É uma fonte importante de ácidos fenólicos (como o ácido elágico) e flavonoides (como a quercetina, rutina e antocianinas, os últimos sendo corantes naturais). Dentre as antocianinas, destacam-se a delphinidina-3-glicosídeo, a petunidina-3-glicosídeo e a malvidina-3-glicosídeo (LIMA et al., 2007; MIGLIATO et al., 2007; REYNERTSON et al., 2008)

3.6 Eletroforese em gel SDS-PAGE

A eletroforese é uma técnica que foi descrita por Laemmli em 1970. Nesta técnica, o dodecil-sulfato de sódio (SDS) confere carga negativa às proteínas, facilitando a separação por peso molecular. Essa mobilidade está relacionada diretamente ao tamanho da proteína. Outro fator que influencia na mobilidade proteica no gel, é o tamanho dos poros do mesmo. A amostra de proteínas que será aplicada no gel é tratada para estar solubilizada, sendo também desnaturada com a quebra das pontes dissulfeto, forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio (DAVIS, 2012).

Na solução de tratamento da amostra podem ser utilizados agentes dissociantes (por exemplo ureia, ácido etilenodiamino tetra-acético), redutores (2-mercaptoetanol, ditioneírol), detergentes aniônicos (SDS, desoxicolato de sódio) e, em algumas situações, detergentes não-aniônicos (Tween 20, Triton X-100) (DAVIS, 2012).

A coloração do gel tem por finalidade a identificação da composição de proteínas e peptídeos. A coloração realizada pelo Coomassie blue possui sensibilidade na faixa de 30-100 ng de proteína, E é um método menos sensível, porém mais simples que o método de nitrato de prata que possui grande sensibilidade, na faixa de 0,1 ng de proteína por ponto protéico, porém possui como desvantagem ser um método mais demorado de trabalho (DAVIS, 2012).

Conforme o princípio da eletroforese, as frações proteicas sofrem ação de carga elétrica, migrando para o polo positivo. As proteínas de menor tamanho migram com maior velocidade que as proteínas de tamanho maior pela barreira física estabelecida pelo sistema do gel. Uma vez separadas pelo tamanho, a posição das proteínas é definida por comparação à migração de um padrão de moléculas de tamanho molecular conhecido. Dessa forma, é possível determinar com precisão o tamanho molecular de proteínas entre 5 e 250 kDa (LABORATÓRIO DIAGNOSTICAL, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

Soro de queijo, leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), e soro de queijo de cabra em pó fornecido pela Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral), β -galactosidase, açúcar, jambolão, cultura iniciadora de *Streptococcus thermophilus* (TA40, DuPont) e culturas probióticas de *Lactobacillus casei* (BGP93, Sacco)

4.2 Preparo dos produtos lácteos de soro em pó de queijo de cabra

4.2.1 Obtenção do soro de queijo

Foram fornecidos pela Embrapa Caprinos e Ovinos de Sobral- CE, lotes de soro de queijo de cabra, sendo estes de dois tipos: soro fluido *in natura* congelada (não tratado termicamente) e soro seco em *spray dryer*. Onde foram processados e tratados termicamente obtendo-se o soro sendo armazenados posteriormente a -18 ± 3 °C até o momento do seu uso para o preparo da base láctea.

4.2.2 Secagem do soro por atomização

As amostras de soro atomizado em pó foram fornecidas pela Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na cidade de Sobral-CE. O soro utilizado para a secagem foi obtido a partir do processamento de queijo tipo coalho de cabra. O soro foi seco em mini-atomizador Büchi, modelo B-290, empregando-se temperatura de entrada de 160°C, temperatura de saída de 90-92°C, fluxo de ar em condições normais de temperatura e pressão igual a 667 L/h e velocidade de bombeamento igual a 25 ml/min.

4.2.3 Produto lácteo sem açúcar

O soro de queijo de cabra tipo coalho em pó foi reconstituído em água destilada (20 %, m/m). Em seguida, foi tratado termicamente a 85°C por um período de 30 minutos e resfriado até 45°C para adição das culturas lácticas (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005). As culturas utilizadas para as formulações foram: *Streptococcus thermophilus* (TA40, DuPont) e

Lactobacillus casei (BGP93, Sacco) Depois de adicionada a cultura láctica, o soro reconstituído foi incubado a 45 °C em estufa microprocessada. Após a fermentação, os produtos foram armazenados sob refrigeração a 4 °C por 7 dias.

4.2.4 Produto lácteo adoçado

O soro de leite de cabra foi reconstituído com água destilada (20 g/100 g), aquecido a 85° C durante 30 min e depois arrefecido até 45° C antes da adição de culturas lácteas: *S. thermophilus* a uma concentração de 0,030 mg/L nos ensaios controle e probiótico, e *L. casei* em uma concentração de 0,200 mg/L apenas no produto probiótico. No final da fermentação (43 ± 2° C durante aproximadamente 6 h, quando o soro de leite reconstituído fermentado atingiu uma acidez de 0,6 g/100 g ou superior), o xarope de sacarose (com 70 ± 1 g de sólidos solúveis em 100/g) foi adicionado na proporção de 15 g/100 g da formulação total. A bebida foi armazenada a 4 ± 1 ° C por 21 dias.

4.3 Preparo da bebida láctea com jambolão

4.3.1 Obtenção dos frutos de jambolão

Os frutos de jambolão foram coletados no estado da Paraíba no período de sua safra. Estes frutos foram selecionados, lavados e higienizados com hipoclorito de sódio (200mg/L). Após trituração e pasteurização, foram imediatamente congelados a -18 °C.

4.3.2 Obtenção do soro de queijo para a elaboração da bebida láctea com jambolão

O soro lácteo foi obtido a partir do processamento de queijo de Minas frescal, no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA) da Universidade Estadual da Paraíba. O soro coletado foi tratado termicamente e armazenado a -18±3 °C até o momento do seu uso para o preparo da base láctea.

4.3.3 Preparo da base láctea

O soro, após seu descongelamento sob refrigeração a 4±1 °C, foi transferido para frascos de vidro de borossilicato e aquecido a 85 °C por 5 min para inativação das enzimas do

coagulante utilizado na fabricação de queijos, sendo após adicionado leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) e açúcar granulado (Estrela, Biosev), ambos na proporção de 8 g/100 g. A mistura foi agitada até a completa dissolução dos ingredientes e tratada termicamente a 85 °C por 30 min.

4.3.4 Etapas de fermentação e adição das culturas

À base láctea foi realizada a adição das culturas de *Streptococcus thermophilus* (TA 40) na proporção de 0,003 g/100 g e da cultura probiótica comercial de *Lactobacillus casei* (BGP93), na proporção de 0,02 g/100 g. A base láctea foi fermentada a $43 \pm 2^\circ\text{C}$ até atingir acidez superior a 0,7 g de ácido láctico/100 g, sendo imediatamente adicionada da polpa de fruta (jambolão) na proporção de 15 g/100 g de produto final.

4.4 Períodos de amostragem

As amostras de soro reconstituído de cabra foram coletadas para as análises antes da adição das culturas (SR), após a adição das culturas antes do início da fermentação (STI), ao final da fermentação (STF), e após 1 e 7 dias de armazenamento a 4°C (SD1 e SD7, respectivamente). Todas as análises foram realizadas a partir de amostras previamente congeladas a -18°C nos períodos de amostragem mencionados.

Os períodos de amostragem da bebida de cabra com sacarose foram avaliados nos produtos congelados a -18°C, no soro fluido (SF), antes da adição de culturas (SR) e ao longo do armazenamento em CD1, CD7, CD14 e CD21.

Os períodos de amostragem da bases lácteas sem lactose e jambolão foram avaliados nos produtos congelados a -18°C, após a adição das culturas antes do início da fermentação (BTI), ao final da fermentação (BTF) e ao longo do armazenamento em JD1, JD7, JD14 e JD21.

4.5 Análise proteolítica

No produto de soro de queijo caprino, a análise eletroforética foi realizada nas amostras de soro fluido *in natura* (SF), soro em pó reconstituído sem a adição de culturas (SR), soro adicionado da cultura starter e da bactéria probiótica *L. casei* BGP93 (tratamento não adoçado) nos tempos iniciais e finais de fermentação (STI e STF, respectivamente) e após

1 e 7 dias de armazenamento (SD1 e SD7, respectivamente) e no produto adoçado também foi analisado após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (CD1, CD7, CD14 e CD21, respectivamente). Foi utilizado o sistema PAGE-SDS-2 β -mercaptoetanol, descrito por Laemmli (1970) e Donkor (2007), adaptado para o uso de géis de separação em placas (10,5 \times 10 \times 0,4 cm) (Hoefler SE250). O gel de aplicação contendo 6% de poliacrilamida será montado em tampão Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8 e o gel de separação, com gradiente de 17,5% de poliacrilamida, foi montado em tampão Tris-HCl 3,77 M, pH 8,9.

As amostras submetidas à eletroforese foram suspensas em tampão amostra composto de 5ml de glicerol, 2,5ml de Tris-HCl 0,6 M (pH 6,8), 2,5mg de azul de bromofenol, 0,3ml de 2 β - mercaptoeptanol, 5ml de solução de SDS a 10%, completando o volume para 25ml com água deionizada. As amostras, foram preparadas de tal forma que apresentassem de 2 a 4 mg de proteína/ml de tampão da amostra, depois foram tratadas a 100°C por 10 min e centrifugadas em centrífuga Parsec (modelo CT 0603) a 3.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 10 μ l que foram aplicadas nos poços do gel.

A corrida eletroforética foi realizada em tensão constante de 200 V. Após a eletroforese, o gel foi corado em azul de Coomassie R-250 a 0,1%, preparado em metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v), e descorado com metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v). Logo após os géis tratados com azul de Coomassie R-250 foram corados também com nitrato de prata e revelados com solução reveladora composta de 6g de carbonato de sódio, 50 μ l de formaldeído, 2ml de tiosulfato de sódio a 20%. Para avaliar o peso molecular das unidades proteicas separadas, o gel foi calibrado com marcador proteico contendo 12 proteínas de pesos moleculares 200; 116; 97; 66; 55; 45; 36; 29; 24; 20; 14,2 e 6,5 kDa (SigmaMarker Wide Range 6.500-200.000 Da, Sigma-Aldrich).

No produto com jambolão, a análise eletroforética foi realizada nas amostras nos tempos iniciais e finais de fermentação (BTI e BTF, respectivamente) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (JD1, JD7, JD14 e JD21, respectivamente). Também foi utilizado o sistema PAGE-SDS-2 β -mercaptoetanol, descrito por Laemmli (1970) e Donkor (2007), adaptado para o uso de géis de separação em placas (10,5 \times 10 \times 0,4 cm) (Hoefler SE250). O gel de aplicação contendo 5% de poliacrilamida foi montado em tampão Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8 e o gel de separação, com gradiente de 15% de poliacrilamida, foi montado em tampão Tris-HCl 3,77 M, pH 8,9.

As amostras submetidas à eletroforese foram suspensas em tampão amostra composto de 5ml de glicerol, 2,5ml de Tris-HCl 0,6 M (pH 6,8), 2,5mg de azul de bromofenol, 0,3ml de

2 β -mercaptoeptanol, 5ml de solução de SDS a 10%, completando o volume para 25ml com água deionizada. As amostras, foram preparadas de tal forma que apresentassem de 2 a 4 mg de proteína/ml de tampão da amostra, depois foram tratadas a 100°C por 10 min e centrifugadas em centrífuga a 3.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi separado e alíquotas de 10 μ l foram aplicadas nos poços do gel.

A corrida eletroforética foi realizada em tensão constante de 600 V a 4 °C utilizando sistema de circulação de água sob refrigeração (Hoefler RCB20-Plus). Após a eletroforese, o gel foi corado em azul de Coomassie R-250 a 0,1%, preparado em metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v), e descorado com metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v). Logo após os géis tratados com azul de Coomassie R-250 foram corados também com nitrato de prata e revelados com solução reveladora composta de 6g de carbonato de sódio, 50 μ l de formaldeído, 2ml de tiosulfato de sódio a 20%.

Para avaliar o peso molecular das unidades proteicas separadas, o gel foi calibrado com padrões de proteínas do soro. O padrão foi preparado utilizando as proteínas IgG (IgG from Goat Serum I9140, Sigma, 0,025 mg/10 μ L), α -La (α -Lactalbumin from bovine milk L5385, Sigma, 0,025 mg/10 μ L), β -Lg (β -Lactoglobulin from bovine milk L3908, Sigma, 0,025 mg/10 μ L) e SA (Bovine Serum Albumin A2153, Sigma, 0,025 mg/10 μ L), seguindo-se o tratamento com o tampão para desnaturar as proteínas. Foram utilizados 10 μ L de proteína padrão por poço.

O gel corado foi fotografado em scanner e a imagem obtida foi processada através do programa GelAnalyzer.

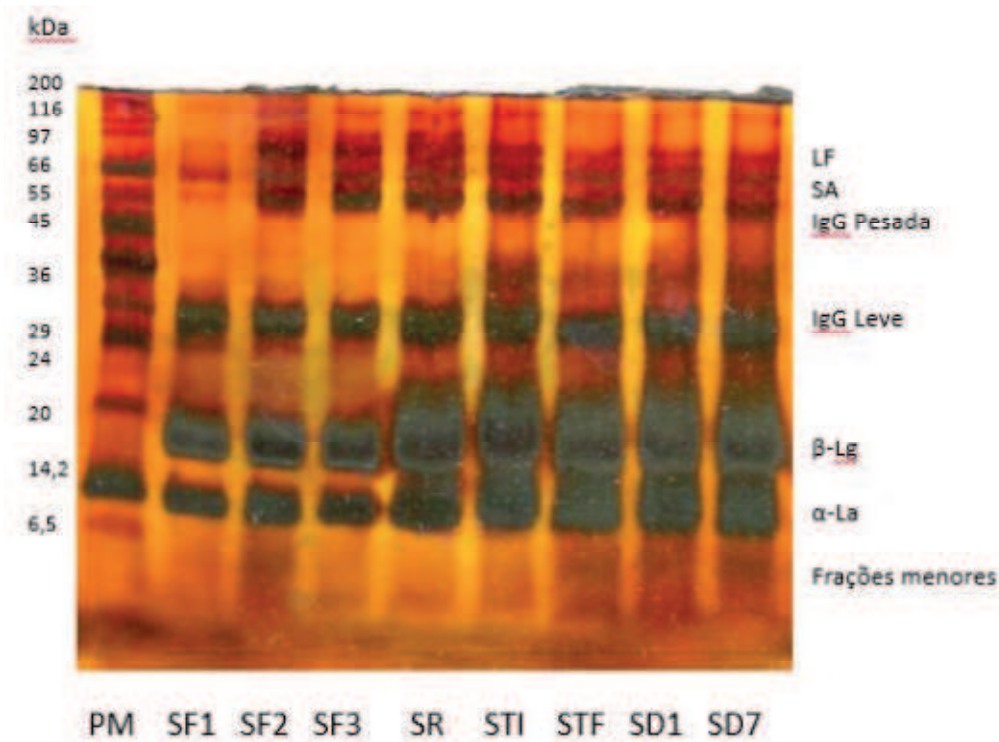
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos produtos lácteos caprinos

A análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 17,5%, das proteínas presentes no soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó caprino reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93, antes da fermentação (STI), após a fermentação (STF) e após 1 (SD1) e 7 dias de armazenamento (SD7), juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM) é apresentada na Figura 1.

O gel da Figura 1 apresenta as bandas bem definidas das proteínas LF, SA, IgG, β -Lg, α -La nas regiões de aproximadamente 86 kDa, 67 kDa, 52 kDa, 18,4 kDa e 14,3 kDa, respectivamente (CASPER et al., 1998; SGARBIERI, 2005) e proteínas de frações moleculares menores. Todas as amostras após o tratamento térmico a 85°C por 30 min (STI, STF, SD1 e SD7) apresentaram perfil semelhante, com bandas proeminentes, equivalentes às proteínas α -La, β -Lg, Ig de cadeia leve, Ig de cadeia pesada, SA e LF, respectivamente (NOBRE, 2015). Tais proteínas também foram relatadas por Raimondo et al (2013) ao realizar o proteinograma de cabras da raça Saanem através de SDS-PAGE em gel de 12%, por Salvatore et al. (2014) ao investigar a influência da concentração de proteína de soro, obtido por ultrafiltração, no rendimento de 4 misturas de ricota fresca ovina, e por Casper, Wendorff e Thomas (1998) ao determinar a variação sazonal na composição das proteínas do soro de leite brutas e individuais de queijos comerciais de caprinos e ovinos por SDS-PAGE em gel de 12,5%.

Figura 1 – Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 17,5%, das proteínas presentes no soro fluido *in natura* de queijo de cabra (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* (TA40) e *L. casei* (BGP93) antes da fermentação (STI), após a fermentação (STF) e após 1 (SD1) e 7 dias de armazenamento (SD7), juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM).



Fonte: Dados de pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgGPesada: imunoglobulina de cadeia pesada, IgGLeve: imunoglobulina de cadeia leve; β -Lg: betalactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina; FM: frações menores.

O densitograma, ou seja, análise densitométrica formam gráficos com picos que representam as subunidades proteicas separadas (NOBRE, 2015). A análise densitométrica, gerada pelo programa Gel Analyzer, das proteínas presentes nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93, antes da fermentação (STI), após a fermentação (STF) e após 1 (SD1) e 7 dias de armazenamento (SD7), analisadas por SDS-PAGE, está apresentada na Figura 2.

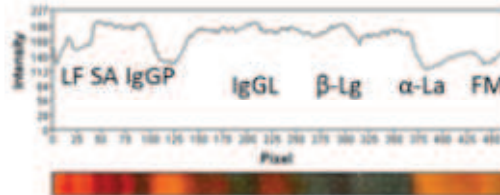
Os densitogramas apresentam as bandas divididas de acordo com os pesos moleculares das proteínas que sofreram alterações de acordo com o processamento aplicado às amostras (NOBRE, 2015).

Figura 2 – Análise densitométrica, gerada pelo programa GelAnalyzer, das bandas das proteínas obtidas por SDS-PAGE presentes no gel 17,5% nas amostras soro fluido *in natura* de queijo de cabra (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* (TA40) e *L. casei* (BGP93) antes da fermentação (STI), após a fermentação (STF) e após 1 (SD1) e 7 dias de armazenamento (SD7).

SF1



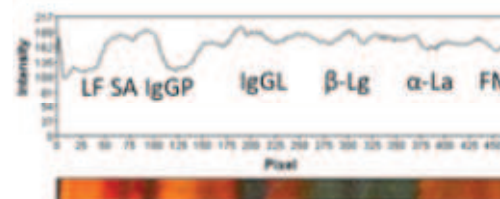
STI



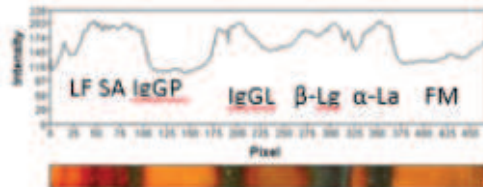
SF2



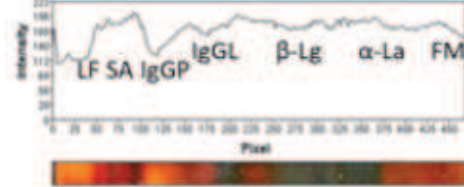
STF



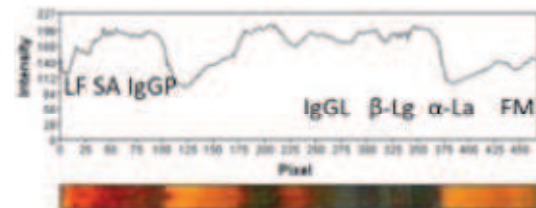
SF3



SD1



SR



SD7



Fonte: dados de pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgGP: imunoglobulina de cadeia pesada, IgGL: imunoglobulina de cadeia leve; β -Lg: betalactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina; FM: frações menores.

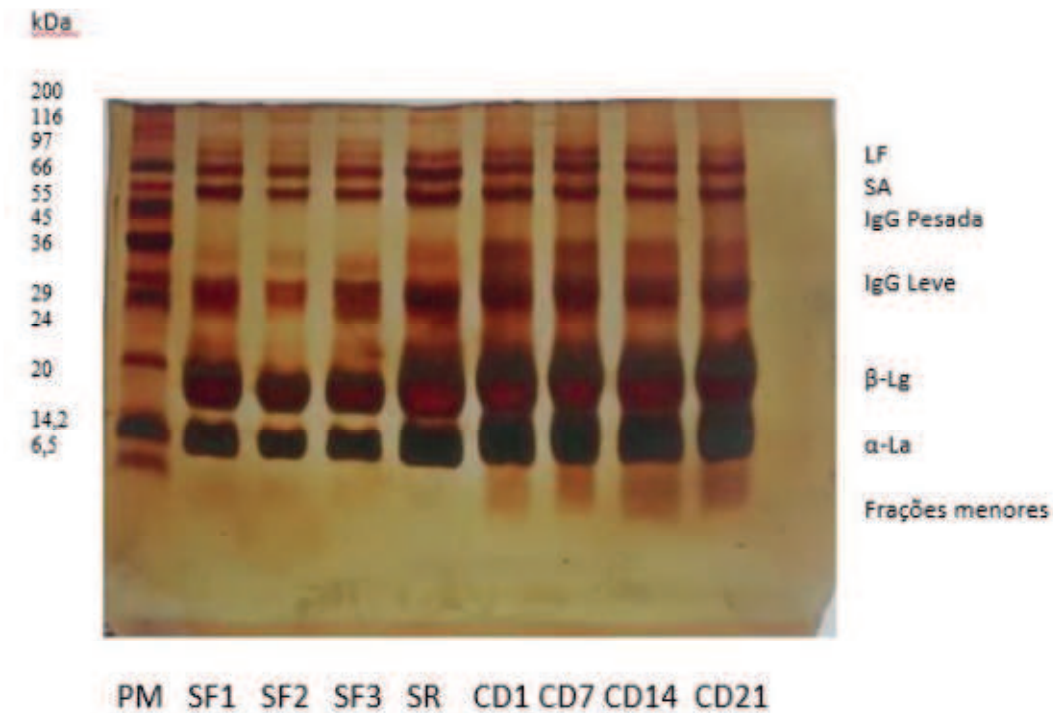
Os densitogramas correspondentes aos soros fluidos (SF1, SF2, SF3), com amostras não adicionadas de microrganismos e que não passaram por tratamento térmico, apresentam picos relacionados às proteínas LF, SA, IgG, β Lg e α -La bem evidentes. Por outro lado, o soro reconstituído apresentou bandas na região de aproximadamente 18,3 a 14,3 kDa sem uma dissociação nítida para as proteínas β -Lg e α -La, aparentando ser uma única banda, provavelmente em função do calor empregado na secagem da amostra. De fato, de acordo com Dzurec e Zall (2011), “o tratamento térmico sofrido pelo leite pode induzir associação entre as proteínas do soro, como entre a α -La e β -Lg”.

Do mesmo modo, o densitograma correspondente ao tempo inicial de fermentação (STI), quem contém o soro reconstituído com a adição de *L. casei*, também apresenta as bandas de β -Lg e α -La unidas, possivelmente devido ao tratamento térmico adicional necessário para a destruição dos microrganismos contaminantes. Por sua vez, no tempo final de fermentação (STF), assim como no primeiro e sétimo dia de armazenamento (SD1 e SD7, respectivamente), verifica-se um aumento da intensidade das proteínas de baixo peso molecular (região das bandas menores que 14,3 kDa), provavelmente devido à proteólise da β -Lg e α -La durante a fermentação pela co-cultura de *S. thermophilus* e *L. casei*. Na Figura 2 as bandas das amostras de STF, SD1 e SD7 apresentaram aumento da intensidade de cor na região de menor massa molar, evidenciando, portanto, o aumento da quantidade de peptídeos em função do metabolismo das bactérias lácticas utilizadas sobre as proteínas do soro.

Na Figura 3, é apresentada uma nova análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 17,5%, das proteínas presentes no soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), no soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR), como também das bebidas lácteas adoçadas fermentadas com *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93, após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (CD1, CD7, CD14 e CD21, respectivamente), juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM).

Assim como para o gel apresentado na Figura 1, as bandas de proteínas no gel da Figura 3 apresentam-se bem definidas para LF, SA, IgG, β -Lg e α -La para todas as amostras avaliadas. Apenas para as bebidas adoçadas analisadas ao longo do armazenamento (CD1, CD7, CD14 e CD21) é possível observar nitidamente as proteínas de frações moleculares menores que 14,3 kDa.

Figura 3 – Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 17,5%, das proteínas presentes no soro fluido *in natura* de queijo de cabra (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e bebidas lácteas caprinas adoçadas adicionadas de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (CD1, CD7, CD14 e CD21, respectivamente) juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM).



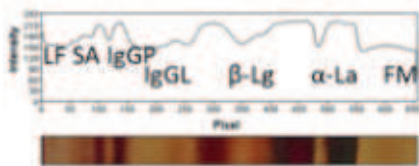
Fonte: dados de pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgGPesada: imunoglobulina de cadeia pesada, IgGLeve: imunoglobulina de cadeia leve; β-Lg: betalactoglobulina; α-La: alfa-lactoalbumina; FM: frações menores.

No densitograma gerado a partir das unidades relevadas no gel corado com nitrato de prata (Figura 4) foi possível observar que as amostras de soro fluido (SF1, SF2, SF3) apresentam picos bem definidos na região de aproximadamente 18,4 à 14,3 kDa. Por outro lado, a amostra de soro reconstituído (SR) não apresentou dissociação nítida para as proteínas β-Lg e α-La, assim como o observado para a mesma amostra no densitograma da Figura 2. Por outro lado, nos densitogramas correspondentes às bebidas adoçadas após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento, verifica-se uma união maior das bandas e um aumento da intensidade das proteínas de baixo peso molecular, conforme foi observado na fotografia do próprio gel (Figura 2).

Tal comportamento foi semelhante ao ocorrido no gel para os produtos caprinos SD1 e SD7 sem a adição de açúcar (Figura 1). Desta forma, a adição de açúcar na bebida não acarretou em mudanças no perfil de degradação das proteínas pelos microrganismos.

Figura 4 – Análise densitométrica gerada pelo programa GelAnalyzer, das bandas das proteínas obtidas por SDS-PAGE, gel 17,5%, nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e bebidas lácteas caprinas adoçadas adicionadas de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (D1, D7, D14 e D21, respectivamente) juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM).

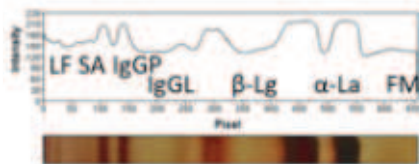
SF1



D1



SF2



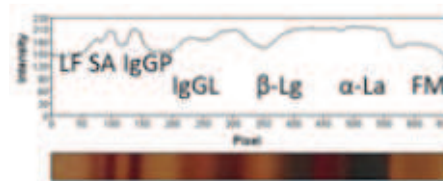
D7



SF3



D14



SR



D21

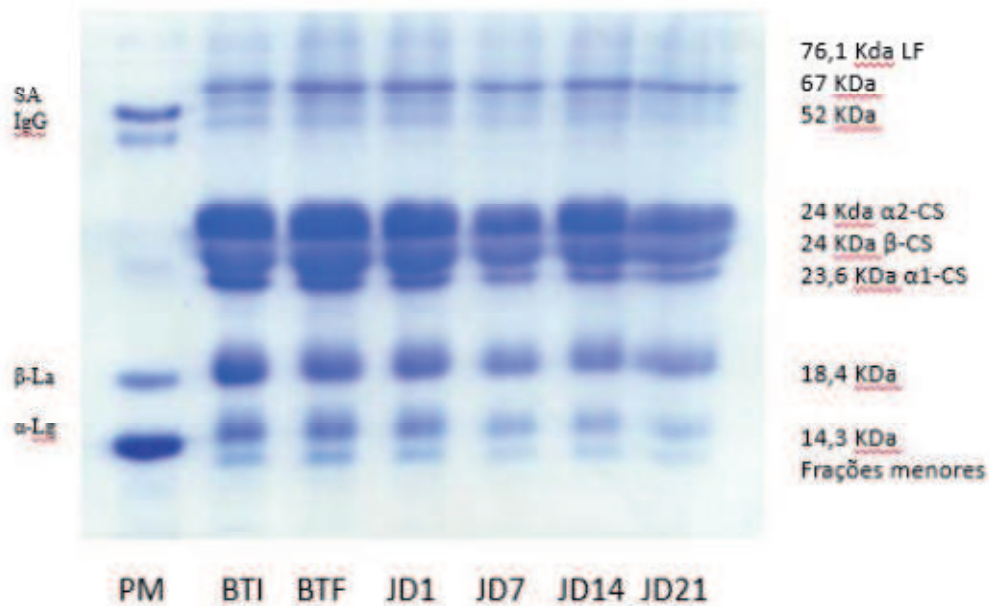


Fonte: dados de pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgGP: imunoglobulina de cadeia pesada, IgGL: imunoglobulina de cadeia leve; β-Lg: betalactoglobulina; α-La: alfa-lactoalbumina; FM: frações menores.

5.2 Avaliação da bebida láctea sem lactose com jambolão

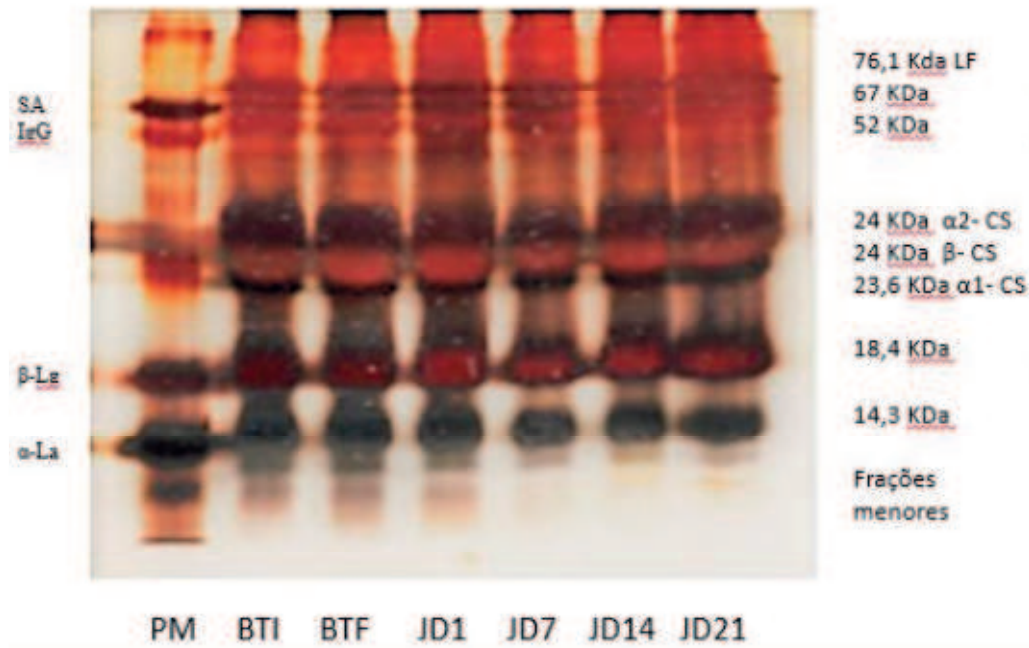
As análises eletroforéticas em sistema SDS-PAGE, gel 15%, das proteínas presentes na base láctea sem lactose adicionada de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93, antes da fermentação (BTI) e após a fermentação (BTF), bem como nas bebidas lácteas sem lactose com jambolão após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (JD1, JD7, JD14 e JD21), juntamente com o padrão proteico com α -La, β -Lg, IgG e SA (Sigma), são apresentadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente, para as colorações por Coomassie Blue e nitrato de prata.

Figura 5- Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 15%, das proteínas, coradas com Coomassie Blue, presentes nas bases lácteas sem lactose adicionadas de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93, antes da fermentação (BTI) e após a fermentação (BTF), bem como nas bebidas lácteas sem lactose com jambolão após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento, (JD1, JD7, JD14 e JD21, respectivamente), com o padrão proteico (α -La, β -Lg, IgG e SA, Sigma).



Fonte: dados da pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgG: imunoglobulina, α 2-CS: alfa2-caseína; β -CS: beta-caseína; α 1-CS: alfa1-caseína; β -Lg: betalactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina; FM: frações menores.

Figura 6- Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 15%, das proteínas, coradas com nitrato de prata, presentes nas bases lácteas sem lactose adicionadas de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93, antes da fermentação (BTI) e após a fermentação (BTF), bem como nas bebidas lácteas sem lactose com jambolão após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento, (JD1, JD7, JD14 e JD21, respectivamente), com o padrão proteico (α -La, β -Lg, IgG e SA, Sigma).



Fonte: dados da pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgG: imunoglobulina, α 2-CS: alfa2-caseína; β -CS: beta-caseína; α 1-CS: alfa1-caseína; β -Lg: betalactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina; FM: frações menores.

O gel corado com Coomassie Blue apresentou picos bem evidentes relacionados às proteínas do soro LF, SA, IgG, β -Lg e α -La, assim como para as frações de caseína β (β -Cs), α 1 (α 1-Cs) e α 2-caseína (α 2-Cs) em todas as bandas referentes às amostras das bases lácteas e das bebidas lácteas com polpa de jambolão. Embora não foram utilizadas caseínas como marcadores de peso molecular neste estudo, sabe-se que as frações β -Cs, α 1-Cs e α 2-Cs são reveladas nas regiões de 24, 23,6 e 23,5 à 24 kDa, respectivamente (SGARBIERI, 2005). Nos géis corados com Coomassie Blue, praticamente não se verifica diferenças entre as bandas das proteínas das amostras de base láctea (BTI e BTF) e das bebidas lácteas com jambolão durante o armazenamento (JD1, JD7, JD14 e JD21).

Segundo informações da literatura, a coloração do gel tem por finalidade a identificação da composição de proteínas e peptídeos, sendo possível a visualização das proteínas separadas. A coloração por Coomassie possui sensibilidade na faixa de 30-100 ng

de proteína, menos sensível que os outros métodos (DAVIS, 2012; PATTON, 2002), porém com a vantagem de ser um método simples.

A coloração com prata possui grande sensibilidade, na faixa de 0,1 ng de proteína por ponto proteico. Porém, este método apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, a demora do processo, podendo-se estender até 7 h de trabalho, além da possibilidade de gerar coloração negativa em regiões saturadas de proteínas do gel (DAVIS, 2012).

Os fatores citados acima explicam as diferenças existentes entre os géis corados com as duas técnicas para as amostras pertencentes ao mesmo lote (Figuras 5 e 6), assim como para os seus respectivos densitogramas (Figuras 7 e 8).

Para as amostras coradas com nitrato de prata, verifica-se menor separação das bandas de β -Lg e α -La, particularmente para as amostras BTI, BTF e JD1, tanto no gel, como no respectivo densitograma. No densitograma, tais proteínas em BTI, BTF e JD1 tenderam a aparentar ser uma única banda. Conforme Dzurec e Zall (2011), “[...] o tratamento térmico sofrido pelo leite pode induzir associação entre as proteínas do soro, como entre a α -La e β -Lg”, podendo ser uma explicação para as bandas das proteínas coradas com nitrato de prata das amostras analisadas no presente estudo que sofreram a ação do calor empregado na secagem do leite em pó, utilizado no preparo da amostra e do tratamento térmico para a destruição dos microrganismos contaminantes da base láctea.

Uma vez que nos géis corados com Coomassie Blue esse fenômeno não foi observado, provavelmente as associações entre tais proteínas do soro foram em concentração menor que 30 ng por ponto proteico e, portanto, não reveladas por tal técnica.

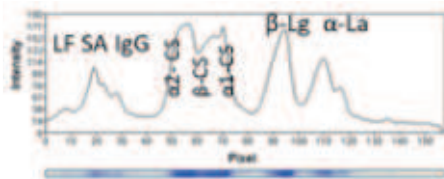
Ainda, para as amostras BTI, BTF e JD1, verifica-se no gel corado com nitrato de prata a presença de bandas de fragmentos proteicos menores que 14,3 kDa, as quais tendem a reduzir durante o armazenamento da bebida láctea. Tais fragmentos são provavelmente peptídeos liberados para o soro durante a fabricação do queijo e durante a fermentação da base láctea (GOBBA et al., 2014).

De modo similar ao provavelmente ocorrido para as interações de α -La e β -Lg, a ausência da revelação dos fragmentos proteicos nos géis corados com Coomassie Blue reforça a importância da coloração com prata para a identificação de proteínas em concentrações menores que 30 ng por ponto proteico.

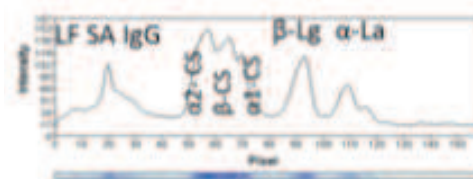
Com relação às outras bandas, houve poucas variações dos picos entre os produtos analisados nos diferentes períodos de amostragem, tanto para as bases lácteas, como para as bebidas lácteas ao longo do armazenamento.

Figura 7 – Análise densitométrica gerada pelo programa GelAnalyzer, das bandas das proteínas obtidas por SDS-PAGE, gel 15%, coradas com Coomassie Blue, nas amostras de base láctea sem lactose adicionadas de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 antes e após a fermentação (BTI e BTF, respectivamente) e das respectivas bebidas lácteas com jambolão após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (JD1, JD7, JD14 e JD21, respectivamente) juntamente com o padrão com o padrão proteico (α -La, β -Lg, IgG e SA, Sigma).

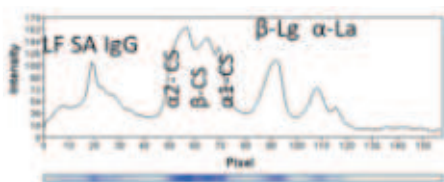
TI



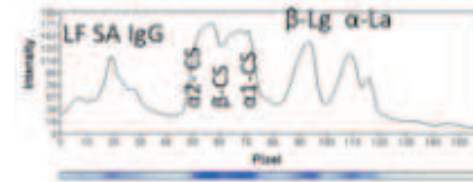
D7



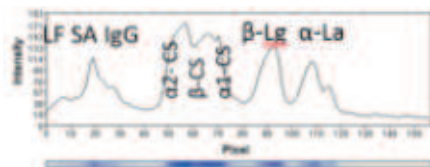
TF



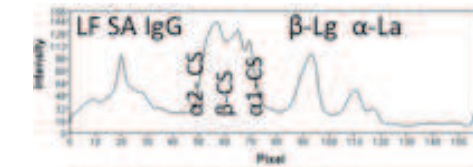
D14



D1

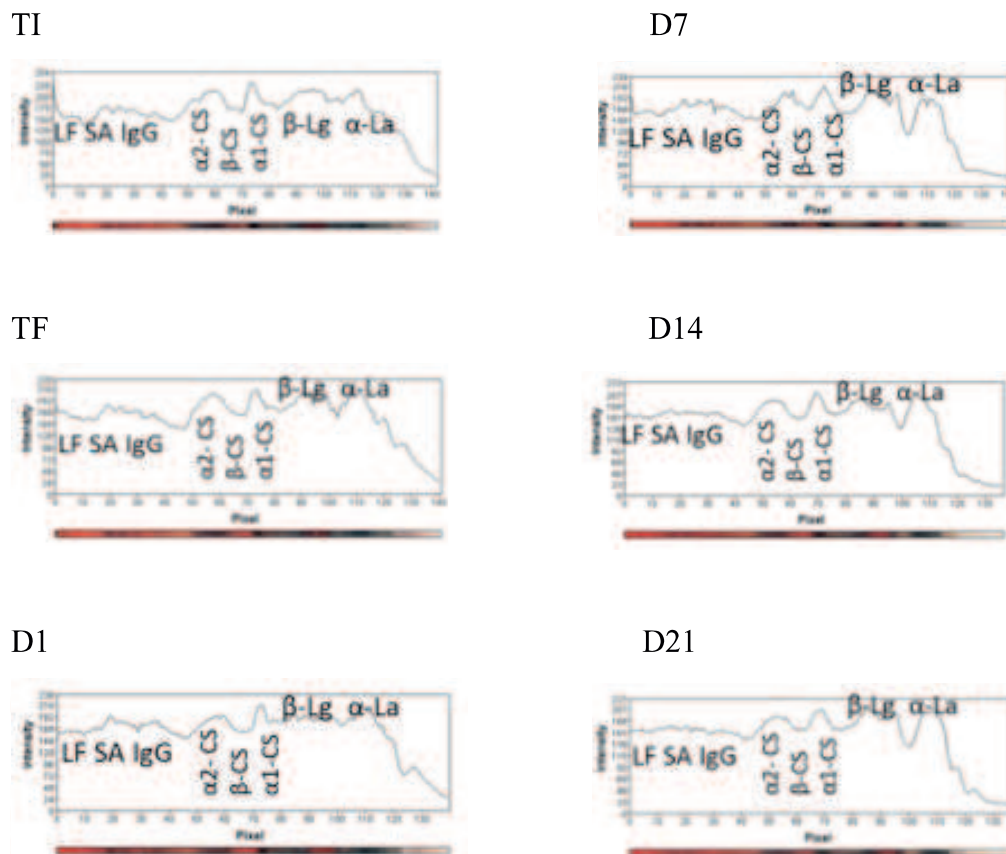


D21



Fonte: dados da pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgG: imunoglobulina, α 2-CS: alfa2-caseína; β -CS: beta-caseína; α 1-CS: alfa1-caseína; β -Lg: betalactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina.

Figura 8 – Análise densitométrica gerada pelo programa GelAnalyzer, das bandas das proteínas obtidas por SDS-PAGE, gel 15%, coradas com nitrato de prata, nas amostras de base láctea sem lactose adicionadas de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 antes e após a fermentação (BTI e BTF, respectivamente) e das respectivas bebidas lácteas com jambolão após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (JD1, JD7, JD14 e JD21, respectivamente) juntamente com o padrão com o padrão proteico (α -La, β -Lg, IgG e SA, Sigma).



Fonte: dados da pesquisa. LF: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgG: imunoglobulina, α 2-CS: alfa2-caseína; β -CS: beta-caseína; α 1-CS: alfa1-caseína; β -Lg: betalactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina.

6 CONCLUSÃO

A realização da eletroforese em SDS-PAGE para as amostras produzidas a base de soro lácteo caprino identificou as proteínas principais LF, SA, IgG, β -Lg e α -La, além de proteínas de frações moleculares menores. As mesmas proteínas foram identificadas na base láctea sem lactose e na bebida láctea de jambolão, como também as frações de caseína β -Cs, α s1-Cs e α s2-Cs, por conter leite em pó em sua composição. Através da coloração de prata foi possível identificar a presença de frações menores, possivelmente de peptídeos liberados durante a fabricação do queijo, como também pelo metabolismo resultante da associação dos microrganismos *S. thermophilus* e *L. casei* sobre as proteínas do soro. Também pela coloração de prata, foi possível identificar a influência do tratamento térmico sobre as proteínas do soro.

Apesar de haver diferenças entre as diferentes formulações estudadas, a adição de açúcar não exerceu influência sobre o perfil proteico dos produtos lácteos caprinos, assim como a adição de jambolão não desencadeou mudanças nas proteínas das bebidas lácteas no primeiro dia de armazenamento quando comparadas às suas respectivas bases lácteas antes e após a fermentação.

Ressalta-se a importância da coloração com nitrato de prata para a identificação de proteínas em concentração muito pequena nas amostras.

REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 03 dez. 1999. Seção 1, p. 23-24.

ALMAAS, H.; ERIKSEN, E.; SEKSE, C.; COMI, I.; FLENGSRUD, R.; HOLM, H.; JENSEN, E.; JACOBSEN, M.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 106, p.896-905, 2011.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctea. **Indústria de Laticínio**, Viçosa, v. 32, p. 50-54, 2001.

BRASIL, R. B.; NICOLAU, E. S.; CABRAL, J. F.; SILVA, A. P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, Rio verde, v. 25, n. 2, p. 71-80, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 ago. 2005. Seção 1, p.7.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n°. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo a. o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, Seção. 1. p. 24. dez. 2012.

BOSSU, C. M. **Fracionamento de zinco em amostras de leite**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química)– Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BURITI, F. C. A.; FREITAS, S. C.; EGITO, A. S.; SANTOS, K. M. O. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 196-203, 2014.

CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Incorporation of fruit flours into fermented milk: acidification profile, viability of probiotics and gastrointestinal tolerance. **International Dairy Journal**, New York, v. 41, p. 1-6, 2015.

CASPER, J. L.; WENDORFF, W. L.; THOMAS, D. L. Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 81, n. 12, p. 3117-3122, 1998.

DASSIOS, T.; RAIKOS, V. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. **Dairy Science & Technology**, Bethesda, v. 9, p. 91–101. March 2014.

DAVIS, R. A. H. **Aspectos proteômicos e determinação de elementos-traço em bÍlis de peixe**: potencial marcador biológico de exposição ambiental. 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Química)– Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

DEMERES, MATHIEU, V; AUDI, J.; LAURIN, E. FLISS, I; SF-GELAIS, D. Impacto f comercial mesophilic and thermophilic starters on the growth of new probiotic isolats. **International Dairy Journal**, New York, v. 45, p. 31–40, 2015

DIAGNOSTICO laboratorial. SDS-PAGE. [S.l.: s.n.], 2010. Disponível em: <<https://imunologiahematologia.worspress.com/2010/06/14/sds-page/>>. Acesso em: 28 maio 2018.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; SINGH, T. K.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P.; ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. **International Dairy Journal**, New York, v. 17, p. 1321-1331, 2007.

DZUREC, D. J.; ZALL, R. R. Effect of heating, cooling, and storing milk on casein and whey proteins. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 68, p. 273-280, Feb. 1985

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GOBBA, C. D.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; OTTE, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, New York, v. 32, p. 175-183, 2013.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, New York, v. 18, p. 677-684, 2008.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**. v. 9, n. 5, p. 455-470. September 2010

GIANEZINE, M.; ALVES, A. B.; TECHEMAYER, C. A.; RÉVILLON, J. P. P. Diferenciação de produto e inovação na indústria agroalimentar: a inserção de alimentos funcionais no Brasil. **Revista de Administração, Contabilidade e Economia**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 9-26, 2012. Edição especial agronegócios.

GOBBA, C.D.; ESPEJO-CARPIO, F.J.; SKIBSTED, L.H.; OTTE, J. Antioxidant peptides from goat milk protein fraction hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, New York, v. 39, p. 28-40, 2014.

GOMES, J. J. L.; **Propriedades nutricionais, reológicas e sensoriais de bebidas lácteas elaboradas a partir de leite de cabra, vaca e a sua mistura**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em ciências da nutrição)– Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 155-63, 2004.

HASSAN, F. A. M.; ABBAS, H. M.; MONA. A. M.; ABD EL- GAWAD. Goats Dairy Products as a Potentially Functional Food. **Life Science Journal**, New York, v. 11, n. 9, p. 648-657, 2014.

KENT, R.M.; GUINAME, C.M.; O'CONNOR, P. M.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R.P. Production of the antimicrobial peptides casein A and B by *Bacillus* isolates growing on sodium caseinate. **Letters in Applied Microbiology**, v.55, p. 141-148, 2012.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 44, n. 3, jul./set., 2008

LIMA, L. A.; SOARES, J. J. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) skeels (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p.860-864, 2007.

MANTHEU, E.; KANAKI, M.; GEORGAKOULI, K.; DELI, C. K.; KOURETAS, D.; KOUTEDAKIS, V.; SAMURTAS, A. Z. Glycemic response of a carbohydrate-protein bar with ewe-goat whey. **Nutrients**, Basileia, v. 6, p. 2240-2250, 2014.

MARLETTA, D.; BORDONARO, S.; GUASTELLA, A. M.; FALAGIANI, P.; CRIMI, N.; D'URSO, G. Goat milk with different α -casein content: analysis of allergenic potency by reast.- innibition assay. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 52, p. 19-24, 2004.

MARQUES, F. M.; SÁ, J. F. O.; SANTOS, M.C.; MARTINS, M.F.; FURTADO, M.A.M. Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 473-9 2011.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L). Skeels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MINEVINI, F.; MARIA TERESA WANCIA, M. T.; SIRAGUESA, S.; GOBBETTI, M.; CAPONIO, F. Fermented goats milk produced with selected multiple startes as a potentially funtional food. **Food Microbiology**, v. 26; p. 559-564, 2009.

NOBRE, M. S M. S. C. **Influência da adição de diferentes culturas de lactobacilos sobre as características de soro de queijo de cabra tipo coalho atomizado (pó) reconstituído fermentado**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina grande, 2015.

OLIVEIRA, A. X.; DELFINO, N. de C.; NEVES, T. de B. S.; SILVA, M. H.; CAETANO, A. JESUS, N. M. SILVA, M. C. A. Enumeração de coliformes totais e bactérias mesófilas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Salvador, Bahia. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 150, p. 235, 2006. Edição Especial.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A.; CAMBERO RODRÍGUES, M. I.; FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, L-GARCÍA SANZ, M. L.; DE FERNANDO MINGUILLÓN, G. D. G.; HOZ PERALES, L.; SELGAS CORTECERO, M. D. **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p. [Alimentos de origem animal - v.2].

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B-Analytical**. Amsterdam, v. 771, p. 3-31, 2002.

RAIMONDO, R. F. S.; BRANDESPIM, F. B.; PRINA, A. P. M.; MIYASHIRO, S. I.; SAUT, J. P. F.; MORI, C. S.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Dynamic in the concentration of whey proteins in the mammary secretion of goats during the dry period. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 113, p. 239-246, 2013.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPEN, A. M.; FILHO, A. D. dos R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**. Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 8, p. 18-25, 2014

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, M. E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits, **Food Chemistry**, Oxford, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, Basel, v. 3, p. 765-791, 2011.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brasilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 8, n.1, p. 43-56, Jan/Mar. 2005.

VARGA, L.; SÜLE, J.; NAGYT, P. Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, Porto, v. 97, n. 4, p. 2039-2044, 2014.

YANGILAR, F. As a potentially functional food: goats' milk and products. **Journal of Food and Nutrition Research**, Newark, v. 1, n. 4, p. 68-81, 2013.