

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO IN NATURA E INDUSTRIALIZADO¹

Taisson Kroth Thomé Da Cruz², Manoel Francisco Mendes Lassen³, Inaiara Rosa De Oliveira⁴, Mara Lisiane Tissot-Squalli⁵.

¹ Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UNIJUI

² Biólogo Licenciado e Bacharel, taisson.kroth@gmail.com

³ Biólogo Licenciado e Bacharel, manoellassen@gmail.com

⁴ Professora Doutora e Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, Campus Santo Augusto, inaiara.oliveira@iffarroupilha.edu.br

⁵ Docente do Departamento de Ciências da Vida (DCVida) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), tutora do Programa de Educação Tutorial – PET-Biologia, tissot@unijui.edu.br

INTRODUÇÃO

O leite é um fluido viscoso secretado pelas glândulas mamárias e considerado o único alimento que atende às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie, por conter diversos nutrientes, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas (SGARBIERI, 2004; EDITORA INSUMOS, 2013).

No Brasil, devido à pecuária bovina, a fonte mais expressiva de leite para alimentação humana tem sido o leite de vaca (EDITORA INSUMOS, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de leite bovino é de cerca de 210L/habitante/ano. A produção brasileira de leite é capaz de fornecer cerca de 170 litros de leite/habitante/ano (BRASIL-MAPA, 2014). Os avanços nas técnicas relacionadas à produção, processamento e distribuição de leite têm favorecido o seu consumo pelo ser humano, particularmente o leite de origem bovina (SILVA, 1997).

O leite bovino é composto de água (87,3%), lactose (4,9%), gordura (3,5 a 3,8%), proteínas totais (3,3 a 3,5%), minerais (0,7%) e vitaminas (SGARBIERI, 2004). No soro do leite bovino, as proteínas somam aproximadamente 20% das proteínas totais, sendo 80% delas representadas pelas caseínas (ANTUNES, 2003). Entre as proteínas do soro de leite bovino, destacam-se as seguintes: α -lactoglobulina (18,4 – 36,8 kDa), um dos principais peptídeos, β -lactoalbumina (14,2 kDa), albumina sérica bovina (BSA – 66 kDa), lactoferrina (~80 kDa) e imunoglobulinas (150 – 1.000 kDa), entre outras (HARAGUCHI et al, 2006; ALMEIDA et al, 2013).

A classificação e a designação dos tipos de leite são determinadas por normas do Ministério da Agricultura, órgão que estabelece os padrões de ordenha, transporte, beneficiamento e armazenamento do leite e também define os padrões de análise e os métodos utilizados para avaliar cada tipo de leite (EDITORA INSUMOS, 2009).

O leite bovino industrializado pode se apresentar sob três formas: pó, fluido e condensado (EDITORA INSUMOS, 2009). Os leites industrializados, principalmente os de origem bovina e os do tipo fluido são utilizados, muitas vezes, como complemento ao leite materno ou como única fonte de nutrientes para algumas crianças, mas também como alimento e fonte de nutrientes para adultos.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Dada sua importância em fases nutricionais distintas na nutrição humana, este trabalho teve por objetivo analisar o perfil proteico do soro de leites bovino in-natura e bovino industrializado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, para verificar semelhanças ou diferenças proteicas entre eles.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite bovino in natura provenientes das raças Jersey/Zebu foram doadas por uma propriedade particular no interior do município de Bozano (RS) e as das raças Holandesa e Jersey pelo Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR) de Ijuí (RS). Os animais estavam em período de lactação entre 3 e 12 meses e não estavam amamentando. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas no experimento. As amostras de leite bovino industrializado UHT, do tipo integral padronizado, foram adquiridas em mercados da cidade de Ijuí (RS) no mês de outubro/2015, tendo sido analisadas três marcas distintas. As amostras foram processadas logo após a compra.

Um volume de $500\ \mu\text{L}$ de cada amostra foi submetido à centrifugação (ALC-61650, Micro Centrifuge-61650; 4214) a $13.000\ \text{rpm}$ por 30 minutos a temperatura de $12^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para retirar a porção lipídica e eventuais restos celulares. Para precipitação da caseína, o sobrenadante obtido foi acidificado com ácido acético 2% até atingir pH 4.2, e mantido em repouso em refrigerador durante a noite. A seguir, alíquotas de $1500\ \mu\text{L}$ colocadas em microtubos foram centrifugadas a $10.000\ \text{rpm}$ por 15 minutos a temperatura de $12^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para remoção da caseína; o sobrenadante obtido teve o pH ajustado para 7.0 com NaOH 1.0M. O sedimento contendo caseína não foi utilizado.

As amostras de soro de leite foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes, seguindo o método descrito por Laemmli (1970). Para a montagem e a corrida eletroforética dos géis foi utilizado o sistema Mini-protean II TETRA CELL® (Bio-Rad), seguindo os procedimentos determinados pelo fabricante. Os géis SDS-PAGE foram submetidos à corrida em temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos com voltagem fixa em 200 V e corrente aberta e em seguida foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises em SDS-PAGE (Figura 1) mostraram perfis muito similares com bandas proteicas variando de 14 a 100 kDa em todas as amostras de leite analisadas.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

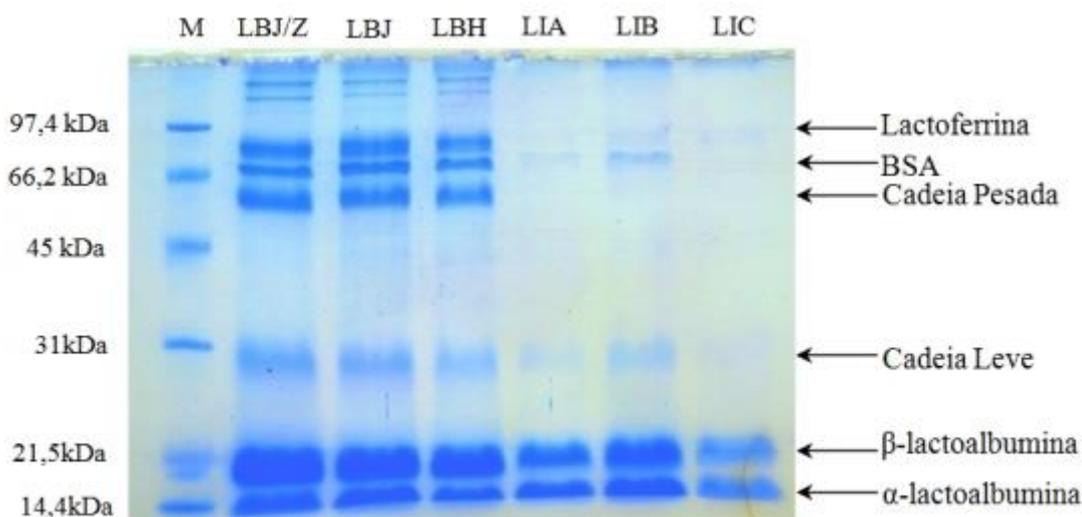


Figura 1. Perfil comparativo de proteínas de amostras de soro de leites bovino in natura e industrializado. M. Marcador de massa molecular; LBJ/Z. Leite bovino Jersey/Zebu; LBJ. Leite bovino Jersey; LBH. Leite bovino Holandesa; LIA. Leite industrializado A; LIB. Leite industrializado B; LIC. Leite industrializado C.

O perfil eletroforético das amostras de leite bovino in natura (Figuras 1, linhas LBJ/Z, LBJ e LBH) foi bastante similar nas três amostras analisadas, mostrando a presença de duas proteínas de alta intensidade de aproximadamente 14 e 18 kDa, correspondendo a β -lactoalbumina e α -lactoglobulina. A α -lactoglobulina, com massa molecular em torno de 18,4 – 36,8 kDa, é a proteína mais abundante no leite bovino e não é encontrada no leite humano. Já β -lactoalbumina, cuja massa molecular é de aproximadamente 14,2 kDa, é considerada a segunda proteína mais abundante no leite bovino (HARAGUCHI et al., 2006).

Outras três proteínas com massa molecular em torno de 50, 66 e 80 kDa aparecem com intensidade bastante similar e uma outra, de aproximadamente 25 kDa, com intensidade menor também foi constatada (Figura 1, linhas LBJ/Z, LBJ e LBH); suas massas moleculares correspondem à cadeia pesada das imunoglobulinas, à albumina sérica bovina (BSA), à lactoferrina e à cadeia leve das imunoglobulinas, respectivamente.

No leite bovino estão presentes quatro das cinco classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE), cujas massas moleculares variam de 150 a 1.000 kDa. A IgG é a principal imunoglobulina do leite bovino, ocupando cerca de 80% do conteúdo imunoglobulínico total e a única que permanece no leite mesmo após a fase de colostro (HARAGUCHI et al., 2006).

As cadeias pesada e leve das imunoglobulinas se separam quando em condições desnaturantes, sendo observado, portanto, após a eletroforese em gel de poliacrilamida, a presença de duas bandas com massas moleculares equivalentes a 50 e 25 kDa, respectivamente (HARLOW et al., 1988 apud PENHA et al., 2010).

A BSA é uma proteína com massa molecular em torno de 66 kDa e representa cerca de 10% das proteínas do soro do leite bovino, enquanto que a lactoferrina, considerada um glicoproteína multifuncional devido a sua habilidade de desempenhar vários papéis biológicos, apresenta uma massa molecular que varia de 78 a 80 kDa (ALMEIDA et al., 2013).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

A análise eletroforética dos perfis proteicos das três amostras de leite bovino industrializado (LI) mostrou um resultado bastante similar. As bandas de 14 e 18 kDa, correspondentes às proteínas β -lactoalbumina e α -lactoglobulina, apresentaram intensidade similar à observada nas amostras de leite in natura, o que reflete a abundância de ambas proteínas no leite bovino (HARAGUCHI et al., 2006). Também é possível visualizar a presença da BSA (66 kDa) e da lactoferrina (~80 kDa) na amostra LIB, porém em intensidade muito baixa quando comparada às amostras de leite in natura. Já nas amostras LIA e LIC, a presença de ambas as proteínas é quase imperceptível. Além disso, foi também possível observar a presença de uma banda de aproximadamente 25 kDa, que provavelmente corresponde à cadeia leve da imunoglobulina. Na amostra LIB essa se apresentou com intensidade semelhante à observada nas amostras de leite in natura, porém na amostra LIA essa mesma banda apareceu com menor intensidade e quase não foi detectável na amostra LIC. Esses resultados evidenciam que os processos pelos quais o leite é industrializado podem reduzir os níveis de algumas proteínas (SAADE et al., 2007).

CONCLUSÃO

Concluimos que o perfil eletroforético do leite bovino in natura foi semelhante nas três amostras analisadas, com bandas proteicas com massas moleculares similares às descritas na literatura. Também, o perfil das amostras de leite bovino industrializado apresentou poucas bandas proteicas, provavelmente devido aos processos físicos e químicos utilizados durante o preparo do leite, os quais podem reduzir os níveis de algumas proteínas. Diante disso, a utilização de leite industrializado como fonte de alimento deve ser avaliada, principalmente para crianças, uma vez que o processamento industrial pode causar alterações no conteúdo nutricional desse alimento.

Palavras-chaves: Proteínas do soro, eletroforese, SDS-PAGE.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Educação Tutorial – PET-Biologia pela bolsa de ensino, pesquisa e extensão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.C. et al. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p.1840 – 1854, 2013.

ANTUNES, A.J.; Funcionalidades de Proteínas do Soro Bovino. Barueri: Manole, 150p. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Plano mais Pecuária / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília: MAPA, 2014. 32p.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

EDITORA INSUMOS – Aditivos e Ingredientes. Os benefícios do leite. São Paulo, SP, 65. Nov/Dez, 2009.

EDITORA INSUMOS – Aditivos e Ingredientes. Propriedades nutricionais do soro do leite. São Paulo, SP, 107. Abr., 2013.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. Rev. Nutr., Campinas, 19 (4): 479-488, jul./ago., 2006.

LAEMMLI, U. K; - Cleavage of Structural Proteins Durin the Assembly of the Head Bacteriophage T2 – Nature – Vol. 227 – August 15, 1970.

SAADE, J. et al. Análise de gorduras e proteínas em leite bovino pela espectroscopia Raman no infravermelho próximo. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. Disponível em <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/exatas/epg/EPG00244_02C.pdf> acessado em 10 de fevereiro de 2016.

SGARBIERI, V. C.; Propriedades Fisiológicas-Funcionais das Proteínas do Soro de Leite – Revista de Nutrição de Campinas. São Paulo. V.17. N.4. P.397-409. Out/Dez. 2004.

SILVA, P.H.F. Leite aspectos de composição e propriedade. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA. N° 6, NOV./ 1997.