

047 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA MICROFLUÍDICA “LAB-ON-A-CHIP” DAS PROTEÍNAS DO LEITE PARA DETECTAR ADULTERAÇÃO DE LEITE BOVINO ADICIONADO COM SORO¹

LAB-ON-A-CHIP MICROFLUIDIC ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF MILK PROTEINS TO DETECT ADDITIONAL WHEY IN BOVINE MILK ADULTERATION

Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos²

Vaneida Maria Meurer³

Isabella Silvestre Barreto Pinto⁴

Laís Stehling de Queiroz Nascimento⁵

Cristiano Amancio Vieira Borges⁶

Antônio Silvio do Egito⁷

Marco Antônio Moreira Furtado⁸

Marta Fonseca Martins⁹

Introdução: O consumo per capita de leite no ano de 2011 foi em torno de 128 litros no Brasil, incluindo seus derivados (leite em pó, queijos, requeijão, iogurte, leite fermentado e outros produtos lácteos). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o queijo é o produto que apresenta maior volume de produção dentre os derivados. A fabricação de um quilo de queijo consome dez litros de leite e recupera-se de nove a dez litros de soro. Nesse contexto, surge um problema mundial da adulteração de leite fluido e em pó pela adição intencional de soro de leite. Isso ocorre em consequência do baixo valor comercial do soro, do reduzido aproveitamento em derivados e subprodutos lácteos e do alto custo para o seu descarte devido às exigências legais. A incorporação indevida do soro no leite de consumo, se não discriminada no rótulo, constitui fraude, uma vez que subtrai elementos no leite genuíno e em outros produtos. No presente trabalho o método “Lab-on-a-chip” foi utilizado para a detecção de fraude de leite fluido bovino pasteurizado, simulada pela adição de soro de leite em níveis crescentes de concentração. A técnica para a detecção foi baseada na quantificação das proteínas do leite (caseínas), e na análise estatística das áreas estimadas sob os picos dos eletroferogramas obtidos nas análises.

Material e Métodos: O leite bovino utilizado foi do tipo pasteurizado. O soro de queijo foi obtido por meio da precipitação enzimática com renina a partir do leite cru. A simulação de fraude foi realizada com adição de soro de queijo ao leite nas seguintes concentrações: 0; 1,0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 50 e 100% (v/v) em amostras de leite pasteurizado. A eletroforese microfluídica foi realizada no equipamento Bioanalyzer 2100 da Agilent, utilizando o kit “Protein 80” sobre condições redutoras, conforme descrito pelo fabricante com adaptações de protocolo para separação de proteínas do leite. O Kit utilizado permite separar proteínas de massa molecular de 5 a 80 kDa, sendo, portanto, ideal para a separação da maioria das

¹Auxílio de Pesquisa Convênio Embrapa/Monsanto

²Estudante de Pós-Doutorado - Embrapa Gado de Leite*/Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). *Rua Eugênio do Nascimento, 610. Juiz de Fora-MG, Cep: 36038-330. E-mail: alessa.siqueira@gmail.com (correspondência)

³Estudante de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivado - UFJF/Embrapa Gado de Leite/EPAMIG. E-mail: vaneida.meurer@ufjf.edu.br

⁴Aluna de Doutorado em Ciências Biológicas - UFJF. E-mail: isabellasbp@gmail.com

⁵Bolsista PIBIC/FAPEMIG - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. E-mail: lais.stehling@gmail.com

⁶Analista da Embrapa Gado de Leite - MG. E-mail: cristiano.borges@embrapa.br

⁷Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos- Sobral - CE. E-mail: antoniosilvio.egito@embrapa.br

⁸Professor Associado - UFJF. E-mail: marcoantoniofurtado@yahoo.com.br

⁹Pesquisador da Embrapa Gado de Leite - MG. E-mail: marta.martins@embrapa.br

proteínas do leite. A massa molecular das proteínas é automaticamente estimada pelo *software* baseado no tempo de eluição e em função do marcador interno (*ladder*).

As amostras foram analisadas em triplicata e duas repetições por meio da ANOVA e do Teste de Dunnett, para comparar o nível 0% (controle) com os demais tratamentos (níveis de 1 a 50% de adição de soro). As análises estatísticas foram realizadas no *software* estatístico R.

Resultados e Discussão:

A massa molecular estimada pela técnica de eletroforese microfluídica das proteínas do soro são mais próximas das estimadas pela técnica convencional de SDS-PAGE do que as estimativas obtidas para as caseínas (Tabela 1). A ordem de eluição no método “Lab-on-a-chip” das caseínas foi β -CN primeiro, α_{s1} -CN em segundo e a κ -CN por último, por isso a massa molecular da κ -CN pela técnica de eletroforese microfluídica foi mais que o dobro da referenciada pela técnica convencional. No entanto esse feito é satisfatório, pois se a κ -CN apresentasse a massa molecular esperada de 19 kDa, isso poderia sobrepor com a β -LG. De um modo geral, todas as caseínas migraram com um peso molecular mais alto do que o observado na técnica convencional fato que pode ser explicado pelo fabricante diante da característica das caseínas de formarem agregados, ou ainda outras propriedades químicas como glicosilação, padrão de fosforilação ou hidrofobicidade que influencia na estrutura da proteína e na interação com o gel matrix durante a separação.

Tabela 1. Leite de vaca. Estimativas da massa molecular das principais proteínas do soro e das caseínas obtidas pela técnica eletroforese microfluídica.

Picos	Proteínas	Massa molecular (kDa) microfluídica	Massa molecular (kDa) SDS-PAGE
1	α -LA	12 \pm 1	14,2
2	β -LG	18 \pm 1	18,4
3	β -CN	32 \pm 1	24,1
4	α_{s1} -CN	37 \pm 1	23,6
5	κ -CN	46 \pm 1	19,0

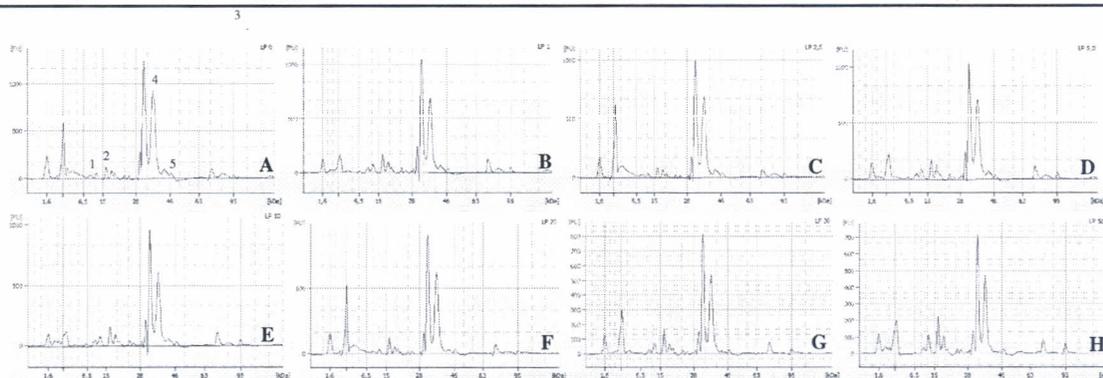


Figura 1. Eletroferogramas das caseínas e das proteínas do soro pelo método lab-on-a-chip das caseínas e das proteínas do soro. A. Leite puro: 1. α -lactoalbumina, 2. β -lactoglobulina, 3. β -caseína, 4. α_{s1} -caseína, 5. κ -caseína; B. Leite + 1% soro; C. leite + 2,5% soro; D. Leite + 5% soro; E. Leite + 10% soro; F. Leite + 20% soro; G. Leite + 30% soro; H. Leite + 50% soro

Conclusões: A análise estatística da variável “área sob o pico”, obtida a partir dos eletroferogramas construídos pela técnica de eletroforese microfluídica, foi eficaz na detecção de fraude do leite pela adição de soro de queijo. Pela análise das concentrações das caseínas α e β do leite, foi possível a detecção de fraude a partir do menor nível de adulteração, da adição de 1% de soro. Na análise da κ -CN, a detecção foi possível a partir do nível de 20%.