

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA "LAB-ON-A-CHIP" (eletroforese em chip) NA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DO LEITE EM AMOSTRAS ULTRACENTRIFUGADAS

Fabiano Freire Costa¹, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito², Marta Fonseca Martins Guimarães², Marco Antônio Moreira Furtado³, Isabela Silvestre Barreto Pinto⁴

¹Pós-Doutorando (PNPD Capes), ²Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite: Rua Eugênio do Nascimento 610; CEP: 36038-330 Juiz de Fora/MG, ³Professor Farmácia-Bioquímica UFJF; ⁴Bolsista BAT II (Fapemig);
e-mail: fafreosta@bol.com.br

INTRODUÇÃO

As técnicas de separação e quantificação das proteínas do leite podem fornecer informações importantes a respeito das propriedades físico-químicas de diferentes sistemas lácteos, auxiliando no aperfeiçoamento tecnológico da produção de derivados mais estáveis, que apresentem melhor qualidade e tempo de vida de prateleira mais prolongado.

Atualmente, a identificação e quantificação das proteínas do leite são feitas por diferentes técnicas de separação como, por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa (CREAMER, 1991; COSTA et al., 2008).

As vantagens e desvantagens de cada técnica são discutidas por diferentes autores que destacam se estas precisam ser aperfeiçoadas, melhorando a confiabilidade dos resultados. Com relação às principais vantagens apresentadas, a automatização e o limite de detecção são os mais citados. Entretanto, o alto consumo de reagentes tóxicos que são posteriormente descartados e o longo preparo das amostras são as desvantagens que cada técnica apresenta (ANDREWS, 1983; CREAMER, 1991; BOBE et al., 1998).

Recentemente, a técnica *lab-on-a-chip* (eletroforese em chip) foi desenvolvida para a separação e quantificação de proteínas, DNA e RNA. Esta técnica tem sido recomendada devido aos bons resultados encontrados em comparação às demais. As principais vantagens estão no tempo de preparo das amostras (~ 30 min/chip), quantidade de reagentes utilizados, em torno de 0,5 mL/chip e no limite de detecção capaz de medir nanogramas de material em microlitros de amostra (WU, 2008, ANEMA, 2009).

O objetivo do trabalho foi testar a metodologia *lab-on-a-chip* para a identificação e quantificação das principais frações protéicas do leite cru no sobrenadante de amostras ultracentrifugadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi analisada uma amostra de leite obtida de um tanque de refrigeração do rebanho experimental da Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco/MG). Um volume de 500 mL de leite foi coletado em frasco estéril, que foi mantido sob refrigeração e encaminhado ao laboratório. Após um período de armazenamento de 4 horas em refrigerador convencional (4°C) foram retiradas quatro alíquotas de 35 mL. As alíquotas foram ultracentrifugadas, em quadruplicata, a 40.000 x g a 20°C por 60 minutos (Sorvall Centrifuges acoplada ao rotor A-841, EUA). Após a ultracentrifugação, o precipitado e o sobrenadante foram separados para análise do perfil protéico. O perfil protéico foi determinado pela metodologia de *lab-on-a-chip* utilizando o equipamento Agilent 2100

Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Alemanha) e o *Protein 80 LabChip Kit* (Agilent Technologies). Frações das proteínas α -caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Sigma-Aldrich/St. Louis, MO, EUA) foram utilizadas como padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na **Figura 1** mostram os eletroferogramas (FU: unidade de fluorescência) de acordo com o peso molecular (kDa) e o tempo de migração (FU x kDa; FU x Tempo) dos padrões individuais de α -caseína, β -caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, e da amostra de leite. De acordo com o aumento do tempo de corrida é possível observar que a β -caseína (Fig 1: D1 e D2) migra mais rápido seguida pela α -caseína (Fig 1: C1 e C2), β -lactoglobulina (Fig 1: B1 e B2) e α -lactoalbumina (Fig 1: A1 e A2), respectivamente. Não foi possível obter informação sobre o padrão da κ -caseína como também foi observado no trabalho de Anema (2009). Com relação à análise da amostra de leite é possível observar separação entre os sinais correspondentes às proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Fig 1: E1 e E2, sinais 1 e 2) e uma sobreposição entre os sinais correspondentes a α -caseína e β -caseína (Fig 1: E1 e E2, sinais 3 e 4 respectivamente). A **Tabela 1** mostra os resultados da quantificação das proteínas dos padrões e da amostra de leite, bem como os pesos moleculares encontrados e a porcentagem de cada uma das frações proteicas.

Comparando os resultados apresentados com os encontrados por Anema (2009) verificou-se que é possível reproduzir com confiabilidade a separação e a quantificação das principais frações proteicas presentes no leite empregando a metodologia de *lab-on-a-chip*. As frações α -caseína, β -caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes no leite foram separadas com alta resolução e quantificadas com boa reprodutibilidade entre os *chips* e desvio padrão aceitável ($\sim 10\%$).

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a metodologia de *lab-on-a-chip* é uma alternativa viável para a separação e quantificação das principais frações proteicas do leite apresentando alta resolução e boa reprodutibilidade, além de ser rápida e utilizar quantidades mínimas (μL) de amostra e reagentes apresenta limite de detecção em $\text{ng}/\mu\text{L}$.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, A. T., TAYLOR, M. D., OWEN, A. J. Proteinases in normal bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, vol. 348, 177-185p. 1983.
- ANEMA, S. G. The use of lab-on-a-chip microfluid SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. *International Dairy Journal*. vol. 19, 198-204p. 2009.
- BOBE, G., BEITZ, D.C., FREEMAN, A. E., LINDBERG, G. L. Sample preparation affects separation of whey proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. vol. 46, 458-463p. 1998.
- COSTA, F. F.; RESENDE, J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.6, p.2165-2174, June 2008.
- CREAMER, L. K. Electrophoresis of cheese. *International Dairy Federation, IDF Bulletin* vol. 261, 14-28p. 1991.
- WU, D., Qin, J., Lin, B. Electrophoresis separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A* 1184, 542-559p. 2008.

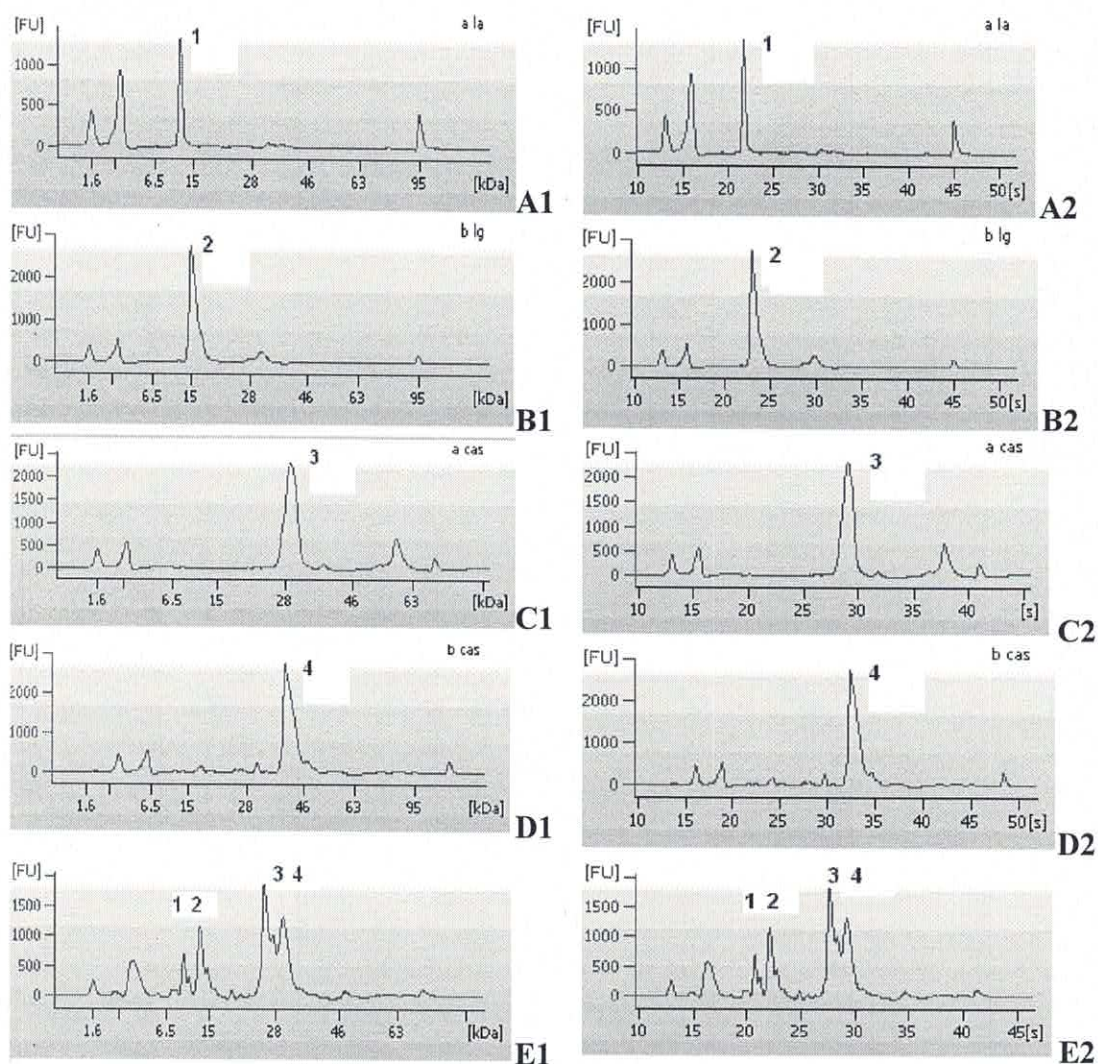


Figura 1. Eletroferogramas obtidos em função do tempo de migração e respectivos pesos moleculares por meio da análise de proteínas-padrão (A1 e A2 = α -lactoalbumina; B1 e B2 = β -lactoglobulina; C1 e C2 = α -caseína; D1 e D2 = β -caseína) e uma amostra de leite (E1 e E2 = sobrenadante do leite ultracentrifugado).

Tabela 1. Determinação e quantificação das frações protéicas (α -la, β -lg, α -cas, β -cas) presentes na amostra de leite ultracentrifugado.

Frações	Padrão			Amostra		
	Peso Molecular (kDa)	Tempo (s)	Porcentagem (%)	Peso Molecular (kDa)	Tempo (s)	Porcentagem (%)
1 α -la	12,2	22	81,4	10,0	22	6,9
2 β -lg	15,0	24	85,9	13,1	23	15,5
3 α -cas	29,3	29	80,9	25,7	27	22,8
4 β -cas	39,9	32	66,9	30,0	29	27,4

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.



**IV CONGRESSO
BRASILEIRO DE
QUALIDADE DO LEITE**

22 a 24 de
Setembro 2010
Florianópolis - SC



PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



Centro de Ciências
Agroveterinárias
Campus III - Lages