

**QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO LEITE BOVINO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA: LINEARIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE BRADFORD**

Quantitation of Total Proteins in Cow Milk by UV Spectrophotometric: Linearization of the Bradford Assay

Alessa Siqueira de Oliveira dos SANTOS¹
Fabiano Freire COSTA¹
Wesley Tinoco ESTEVES¹
Marta Fonseca MARTINS¹
Maria Aparecida Vasconcelos Paiva BRITO¹
Marco Antônio Moreira FURTADO²**1. Introdução**

As caseínas representam cerca de 80% das proteínas totais do leite bovino e são constituídas essencialmente pelas frações: α_{s1} (α_{s1} -CAS), α_{s2} (α_{s2} -CAS), β (β -CAS) e κ (κ -CAS). As soroproteínas representam cerca de 20% das proteínas totais sendo constituídas principalmente pela α -lactalbumina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG), soroalbumina e imunoglobulinas em menores quantidades as quais se encontram solúveis no meio. O desenvolvimento de métodos confiáveis para determinação e quantificação das proteínas totais nos alimentos é uma informação essencial para a garantia da qualidade e segurança dos alimentos comercializados (DZIUBA et al, 2009).

O método baseado na ligação do reagente Coomassie Brilliant Blue (CBB) às proteínas, conhecido como método de Bradford é comumente utilizado para determinação de proteínas em amostras biológicas (BRADFORD, 1976). O reagente se liga a proteínas através de três tipos de interações: eletrostática, onde a arginina (aminoácido básico) interage com o grupo sulfato (carga negativa) do reagente, dos anéis aromáticos do reagente com anéis aromáticos dos aminoácidos, como o triptofano, finalmente, a interação fraca do reagente com aminoácidos polares que tem grupamentos R hidrofóbicos, tais como anel aromático da tirosina (OWUSU-APENTEN, 2002).

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, Bairro Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

²Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.
*alessa.siqueira@gmail.com

Existem vários estudos para a determinação das proteínas comparando sensibilidade, custos, robustez, interferentes e linearidade dos diferentes métodos espectrofotométricos (MOORE et al, 2010), entretanto, não foram encontrados na literatura especializada estudos comparativos da linearidade do método de Bradford nas curvas padrão com diferentes proteínas de leite. Deste modo, o presente trabalho se propôs a avaliar através do modelo de linearização das diferentes curvas de calibração obtidas das proteínas individuais padrões (*blood serum albumin*-BSA, α -LA, β -LG, α_s -CAS, β -CAS e κ -CAS) qual (ais) apresenta (m) melhor confiabilidade para quantificação das proteínas totais do leite bovino utilizando o método de Bradford com leitura no ultravioleta.

2. Materiais e Métodos

O reagente Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Hercules, Califórnia) foi preparado conforme as recomendações do fabricante. As proteínas padrão: BSA, α -LA, β -LG, α_s -CAS, β -CAS e κ -CAS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram preparadas nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$. As medidas de absorbâncias a 595 nm foram realizadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Technologies, Wilmington, USA). Amostras de leite bovino desnatado UHT comercial, nas diluições 1:25, 1:50, 1:100 em água ultra pura foram utilizadas para a determinação das proteínas totais seguindo o método padrão para as medidas de absorbâncias a 595 nm. O teor de proteína total do leite também foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl (HELRICH, 1990). A significância estatística das regressões lineares foi avaliada por análise de variância e teste F com o auxílio do software Microsoft Excel.

3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos permitiram a afirmação de que todas as regressões lineares apresentaram significância, $F > 5$ (AGTERDENBOS et al., 1981). A Tabela 1 mostra os coeficientes das equações de regressão linear, elaboradas a partir de seis níveis crescentes de concentrações com cinco repetições cada. Cada proteína padrão foi analisada pelos parâmetros estatísticos da equação e os respectivos R^2 foram obtidos.

Tabela 1 - Coeficientes analíticos obtidos pela regressão linear das curvas de calibração das proteínas α -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG e BSA.

| Regressão | Proteínas | | | | | |
|-----------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG | BSA |
| A | 4,3963E ⁻⁰⁵ | 5,6233E ⁻⁰⁵ | 3,9033E ⁻⁰⁵ | 5,9386E ⁻⁰⁵ | 3,2000E ⁻⁰⁵ | 5,5237E ⁻⁰⁵ |
| SE _a | 2,5275E ⁻⁰⁶ | 2,2488E ⁻⁰⁶ | 2,3676E ⁻⁰⁶ | 2,3065E ⁻⁰⁶ | 1,3480E ⁻⁰⁶ | 3,4860E ⁻⁰⁶ |
| B | 1,0761E ⁻⁰² | -3,6078E ⁻⁰³ | 9,0589E ⁻⁰³ | 2,1794E ⁻⁰² | 7,8667E ⁻⁰³ | 5,3721E ⁻⁰³ |
| SE _b | 2,1767E ⁻⁰³ | 1,9366E ⁻⁰³ | 2,0390E ⁻⁰³ | 1,9863E ⁻⁰³ | 1,1609E ⁻⁰³ | 3,0021E ⁻⁰³ |
| R ² | 0,9153 | 0,9571 | 0,9066 | 0,9594 | 0,9527 | 0,8997 |

* Todas as curvas consistiram de seis pontos com cinco repetições cada. SE_a - erro padrão do coeficiente A da reta e SE_b - erro padrão do coeficiente B da reta

A Tabela 2 evidencia os resultados quantitativos da proteína total estimada a partir do leite bovino em 3 diluições (1:25; 1:50; 1:100) através de cada curva padrão de calibração pelo método de Bradford. A quantificação da proteína total utilizando a curva padrão da α -LA foi inferior à encontrada pelo método de Kjeldahl, ao passo que, quando comparada com a quantificação obtidas pelas curvas da β -LG, α -CAS e κ -CAS a concentração foi maior à encontrada pelo método de Kjeldahl. A quantificação da proteína total do leite bovino na diluição 1:25 obtidos com as curvas padrões da proteína β -CN e de BSA evidenciou um resultado mais próximo ao obtido pelo método Kjeldahl mostrando uma melhor linearidade das curvas.

Tabela 2 - Concentração da proteína total em amostra de leite bovino obtido a partir da curva de calibração das proteínas pelo método de Bradford.

| Diluição | Concentração \pm Desvio Padrão (mgmL ⁻¹) | | | | | |
|----------|--------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | α -LA | β -LG | α -CN | β -CN | κ -CN | BSA |
| 1:100 | 12,79 \pm 2,83 | 147,09 \pm 5,59 | 65,83 \pm 12,22 | 58,74 \pm 3,42 | 59,33 \pm 16,82 | 46,71 \pm 4,68 |
| 1:50 | 26,76 \pm 1,08 | 94,17 \pm 3,05 | 47,49 \pm 7,58 | 47,52 \pm 2,99 | 60,18 \pm 4,10 | 42,70 \pm 3,54 |
| 1:25 | 23,48 \pm 2,29 | 63,65 \pm 4,87 | 39,81 \pm 0,65 | 30,88 \pm 1,32 | 54,83 \pm 1,90 | 27,95 \pm 3,34 |

* Proteína Total = 30,3mgmL⁻¹ pelo método de KJELDAHL.

Apesar do método de Bradford ser rápido, sensível e estar sujeito a um número bem menor de interferentes que os demais métodos o mesmo apresenta algumas desvantagens como a variação da absorvidade específica para várias proteínas devido à diferença de hidrofobicidade ou no peso molecular, pode sofrer interferência com presença de lipídeos, cloreto de sódio e potássio. As diferenças encontradas entre os métodos podem ser explicados pelo número de resíduos de aminoácidos que interagem com o corante CBB. Quanto maior o peso molecular

observado nas proteínas testadas maior a quantidade de resíduos de aminoácidos disponíveis para interação com o CBB (MOORE et al, 2010).

4. Conclusões

As curvas de calibração montadas a partir das proteínas padrão BSA e β -CAS, utilizando o método de Bradford mostraram os coeficientes de correlação acima de 0,9 as quais exibem um alto grau de linearidade e podem ser usadas para estimar valores desconhecidos com precisão sendo as curvas que apresentaram os melhores resultados para quantificação das proteínas totais do leite.

ABSTRACT

Reliable methods for determination and quantification of total protein in food are essential information to ensure quality and safety of food trade. The objective of this study was to evaluate the linearity of calibration curves obtained from different proteins (blood serum albumin-BSA, α -LA, β -LG, α_s -CAS, β -CAS and κ -CAS) with the reagent of Bradford. Comercial UHT skimmed bovine milk was analyzed for the determination of total protein using the Bradford method by reading the UV at 595 nm. The determination of the concentrations of total milk protein was achieved by linear regression. The Bradford method showed a high sensitivity for the determination of total proteins in bovine milk dilution 1:25 to values closer to those obtained by the Kjeldahl method. The results showed that the calibration curve of standard proteins β -CN and BSA obtained better linearity with less variation in the absorbance measurements for the determination of total protein of milk.

Referências bibliográficas

AGTERDENBOS, J; MAESSEN, F. J. M. J; BALKE, J. Calibration in quantitative analysis. Part 2. Confidence Regions for the Sample Content in the Case of Linear Calibration Relations. **Analytica Chimica Acta**, v. 132. p. 127-137, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v. 72, p. 248-254, 1976.

DIZIUBA, J; MINKIEWICZ, P; DAREWICZ, M; DZIUBA, B; Milk Protein: In: Nollet, L. M. L; Toldra, F. (Org.). **Handbook of Dairy Foods Analysis**. CCR Press Taylor & Francis Group. 2009. p.920.

HELRICH, K. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists** (15th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists Inc., 1990.

MOORE, J.C; DEVRIES, J.W; LIPP, M; GRIFFITHS, J.C; ABERNETHY, D. R. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.330-357, 2010.

OWUSU-APENTEN, R.K. The Bradford method-Principles. In: Owusu-Apenten, R.K. (Org.). **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Marcel Dekker, 2002g. p. 169-194.



ISSN 2176-0810

**Anais do
29º Congresso Nacional de Laticínios**

16 a 19 de Julho de 2012
Juiz de Fora - Minas Gerais



AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO

