

## ANALISE ELETROFORÉTICA DAS CASEÍNAS BOVINAS PARA DETECÇÃO DA ADULTERAÇÃO COM SORO DE QUEIJO EM LEITE BOVINO

### ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF BOVINE CASEIN TO DETECT ADDITIONAL WHEY IN COW MILK

Alessa Siqueira de Oliveira dos SANTOS<sup>1</sup>, Vaneida Maria MEURER<sup>2</sup>, Marissa Justi CANCELLA<sup>3</sup>, Cristiano Amancio Vieira BORGES<sup>4</sup>, Antônio Silva EGITO<sup>5</sup>, Marco Antônio Moreira FURTADO<sup>6</sup>, Marta Fonseca MARTINS<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Pós-Doutorado - Embrapa Gado de Leite/UFJF

<sup>2</sup>Estudante de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados - UFJF

<sup>3</sup>Estudante de Graduação em Farmácia - UFJF

<sup>4</sup>Analista da Embrapa Gado de Leite - MG

<sup>5</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos- Sobral - CE

<sup>6</sup>Professor Associado - UFJF

<sup>7</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite - MG

**Palavra-chave:** bovino, leite, caseínas, fraude, SDS-PAGE

#### Introdução

O consumo per capita de leite por ano foi em torno de 128 litros no Brasil, incluindo seus derivados (leite em pó, queijos, requeijão, iogurte, leite fermentado e outros produtos lácteos). Enquanto que, o consumo per capita de queijo no Brasil é de 4,4 quilos por ano, um dos mais baixos do mundo. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2008), o queijo é o que apresenta maior volume de produção. A fabricação de um quilo de queijo consome dez litros de leite e, dependendo da água utilizada na fabricação, recupera-se de nove a dez litros de soro (RICHARDS, 1997).

As adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas são relativamente frequentes e diversificadas. A adulteração de leites fluidos e em pó através da adição de soro de leite é um problema global. Isso ocorre em consequência do baixo valor comercial do soro, seu reduzido aproveitamento em derivados e subprodutos lácteos e do alto custo para o seu descarte (MAGALHÃES, 2008). A incorporação indevida do soro no leite de consumo, se não discriminada no rótulo, constitui fraude, uma vez que subtrai elementos no leite genuíno (FURTADO, 1989).

Dos componentes proteicos do leite bovino, as caseínas representam 80% das proteínas totais, enquanto que as proteínas do soro ( $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, soroalbumina e imunoglobulinas, lactoferrina) representam 20%. A importância nutricional, funcional e a grande diversidade das proteínas presentes no leite explicam o elevado interesse no estudo da composição desta fração. Desse interesse, tem resultado um acentuado desenvolvimento de métodos analíticos que incluem técnicas que permitem não só a quantificação, como a separação e a identificação das proteínas (VELOSO et al. 2002).

A instrução normativa 68 (BRASIL, 2006) em que aprova como método oficial de determinação de caseínomacropeptídeo (CMP) em leite o emprego de HPLC seguido de eletroforese Capilar e Espectrometria de Massas, metodologia a ser adotada pelos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, entretanto a atividade proteolítica de enzimas produzidas por bactérias psicrotólicas pode acarretar na formação de pseudo-CMP.

O presente trabalho mostrou a aplicação do método eletroforético: SDS-PAGE para identificação dos níveis crescentes de simulações de fraude de leite bovino pasteurizado fluido com soro de queijo fluido através da quantificação das proteínas do leite (caseínas) por meio da análise das áreas dos picos das principais caseínas para possíveis aplicações em leites comerciais e derivados.

SP 6079  
P. 200

## Material e métodos

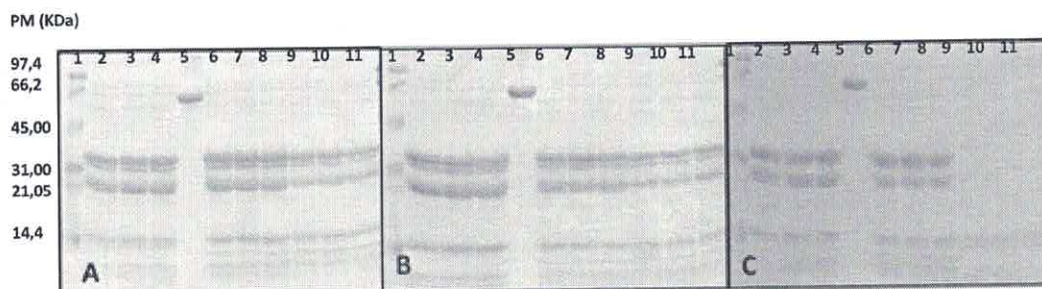
A amostra de leite cru foi coletada no Complexo de Gado Puro do Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco - MG). O soro de queijo foi obtido por meio da precipitação enzimática com renina a partir do leite cru. A simulação de fraude foi realizada com adição de soro de queijo ao leite nas seguintes concentrações: 0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 50 e 100%, v/v em amostras de leite pasteurizado.

A técnica de eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida em condições redutoras com detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em um sistema de eletroforese vertical (mod. Z352802-1EA Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). De acordo com a metodologia de Laemmli (1970), o gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4% de bisacrilamida (m/v) em 0,5M de tampão Tris-HCl, pH 6,8 contendo 0,1% (m/v) de SDS. O gel de separação foi preparado na concentração de 12,5% de bisacrilamida (m/v) em 1,5 M de tampão Tris-HCl buffer, pH 8,8 contendo 0,1% (m/v) de SDS.

As amostras e o marcador de peso molecular (GE Healthcare Life Science) foram preparados no tampão de amostra 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, contendo 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,025% (m/v) de azul de bromofenol, aquecido a 95°C/5 min e centrifugadas em ultra centrífuga (modelo 2K15, da Sigma), em temperatura ambiente, por 15 minutos a 12.500 x g. As amostras foram aplicadas no gel em triplicatas. A eletroforese foi realizada a 4°C com uma corrente de 60 V por 1 hora, e então, foi aumentada para 200 V por 2 horas. O gel foi corado com 0,1% Coomassie Blue R-250 em 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de metanol e a descoloração com 50% (v/v) de metanol e 20% (v/v) de ácido acético. O gel foi escaneado em escaner convencional e analisado no programa ImageQuanTL (GE Healthcare Life Science). Todas as amostras foram aplicadas em triplicatas no gel com três repetições. A análise estatística foi realizada pelo teste de Dunnett com nível de significância de 5%.

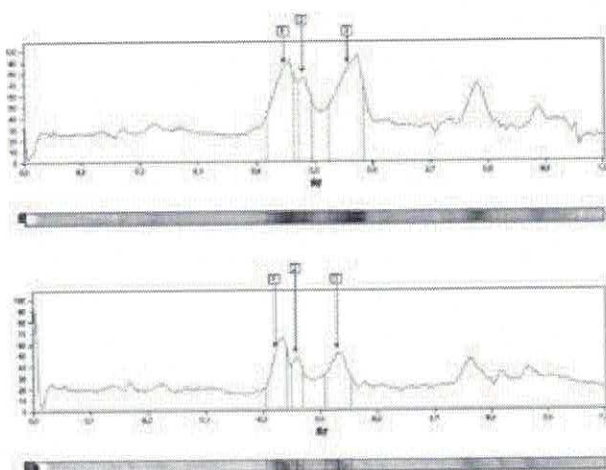
## Resultados e Discussão

Considerando a técnica de eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida com concentração de 12,5%, a caseínas exibiram peso molecular (KDa) que variaram de 21 a 32 (Figura 1). Para o leite de vaca, trabalhos conduzidos em condições similares (PEREIRA, 2003) indicam que as frações caseínicas aparecem na seguinte ordem crescente de mobilidade eletroforética:  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  caseínas.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) com SDS. Simulações de adição de leite bovino cru com soro. **A.** 1-marcadores de massa molecular (fosforilase b, BSA, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina, lisozima); 2,3,4-leite de vaca cru; 5-BSA; 6,7,8-adição de 5%; 9,10,11-adição de 30%; **B.** 1-marcadores de massa molecular; 2,3,4- adição de 1%; 5-BSA; 6,7,8-adição de 10%; 9,10,11-adição de 50%; **C.** 1-marcadores de massa molecular; 2,3,4- adição de 2,5%; 5-BSA; 6,7,8-adição de 20%; 9,10,11-adição de 100%;

Utilizando como amostra padrão (referência) o leite bovino (0%), a técnica de eletroforese de amostras de leite previamente adulteradas mostrou que as áreas dos picos caseínas ( $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  caseínas, respectivamente) diminuíram com a adição de soro (Figura 2).



**Figura 2.** Eletroferograma evidenciando um padrão dos picos das caseínas (1, 2, 3) com resultado da amostra de leite bovino cru (acima) e de outra amostra de leite com adição de 50% de soro (abaixo).

As áreas relativas dos picos caseínas plotadas contra a percentagem de soro de queijo adicionada ao leite cru mostrou que a fraude pode ser detectada a partir de 5 % de adição de soro quando a área do somatório das caseínas foi menor que 15% que a área do somatório das caseínas de leite bovino puro (Tabela 1). Elizabeth et al. (2000) também mostraram que o método de SDS-PAGE para amostras de leite em pó teve sensibilidade para a fraude quando se adicionou 5% de soro ao leite.

**Tabela 1.** Padrão densitométrico da soma das áreas dos picos das caseínas (obtidas pela análise dos géis pelo programa ImageQuantL).

Amostra de Leite	Total do $\Sigma$ área das caseínas
Leite bovino 0%	10224
Leite bovino 1%	9648
Leite bovino 2,5%	9119
Leite bovino 5%	8659
Leite bovino 10%	7559
Leite bovino 20%	7419
Leite bovino 30%	7765
Leite bovino 50%	7214

A análise da média da área do pico da proteína  $\beta$ -caseína foi possível detectar a fraude a partir de 20% de adição de soro pelo teste de Dunnett com nível de significância de 5%, enquanto que pelas  $\alpha_{s2}$  e  $\alpha_{s1}$  estatisticamente não foi possível detectar um nível de fraude a partir do qual a redução da área do pico das proteínas seja significativa considerando leite bovino 0% como controle (Tabela 2).

**Tabela 2.** Média das áreas dos picos da proteína  $\beta$ -caseína das amostras em triplicata em três repetições.

Amostra de Leite	Área proteína $\beta$ -caseína
Leite bovino 0%	4730,0 <sup>a</sup>
Leite bovino 1%	4458,0 <sup>a</sup>
Leite bovino 2,5%	3478,0 <sup>a</sup>
Leite bovino 5%	3550,0 <sup>a</sup>
Leite bovino 10%	3469,3 <sup>a</sup>
Leite bovino 20%	2782,0
Leite bovino 30%	3267,3
Leite bovino 50%	3239,3

\* $p < 0,05$

As proteínas do soro não foram analisadas, pois as bandas das mesmas ficaram muito difusas no gel, o que comprometeu a análise no software. Isso pode ser explicado pela característica da amostra de leite ser fluida, enquanto que Elizabeth et al. (2000) trabalharam com amostras liofilizadas e mostrou que as proteínas do soro aumentaram com a porcentagem de soro adicionado.

A técnica de SDS-PAGE tem sido utilizada para detectar soro de leite adicional em leite e bebidas lácteas por meio da quantificação das proteínas do leite e do soro (ELIZABETH et al., 2000) como também para a detecção do glicomacropéptido (GALINDO-AMAYA et al., 2006).

### Conclusão

O perfil eletroforético das análises dos géis de poli-acrilamida com SDS-PAGE evidenciou que a quantificação das caseínas, considerando a área dos picos, reduziu com a crescente fraude de adição de soro ao leite bovino cru, o que pode ser percebido também com a redução da intensidade das bandas referentes as principais caseínas, mas as proteínas do soro não mostraram resultados satisfatórios. Dessa forma, a técnica de SDS-PAGE foi útil para identificar e quantificar adulteração pela adição de soro em leite e derivados através da análise da área dos picos das caseínas.

### Referências Bibliográfica

DE SOUZA, E.M.T.; ARRUDA, S.F.; BRANDÃO, P.O.; SIQUEIRA, E.M.A. **Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20 (3), 2000.

FURTADO, M. **Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis.** J. Dairy Sci., v.66, 1822-1824, 1983.

RICHARDS, N.S.P.S. **Uso racional de soro lácteo.** Revista Indústria de Alimentos, v.2, 67-69, 1997.

VELOSO, A.C.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.LV.O.; FERREIRA, M.A. **Detecção de adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas,** v.25 (4), 609-615, 2002.



VI CONGRESSO LATINOAMERICANO  
E XII CONGRESSO BRASILEIRO DE

## HIGIENISTAS DE ALIMENTOS

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZOOZOSES  
IV ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO  
DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

23 a 26  
Abril de 2013

Hotel Serrano Resort  
Gramado - RS

OS ALIMENTOS SOB A ÓTICA  
DA SUSTENTABILIDADE:  
ENTRE A CONSCIÊNCIA E A PRÁTICA

GALINDO-AMAYA, L.M.; VALBUENA-COLMENARES, E.; ROJAS-VILLARROEL, E.  
**Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche.** Rev. Científica, FCV-LUZ, v. XVI, 308-314, 2006.

MAGALHÃES, M.A. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

# Higiene

março/abril 2013

Volume 27 - nº 218/219

ENCARTE ELETRÔNICO

ISSN (0101-9171)

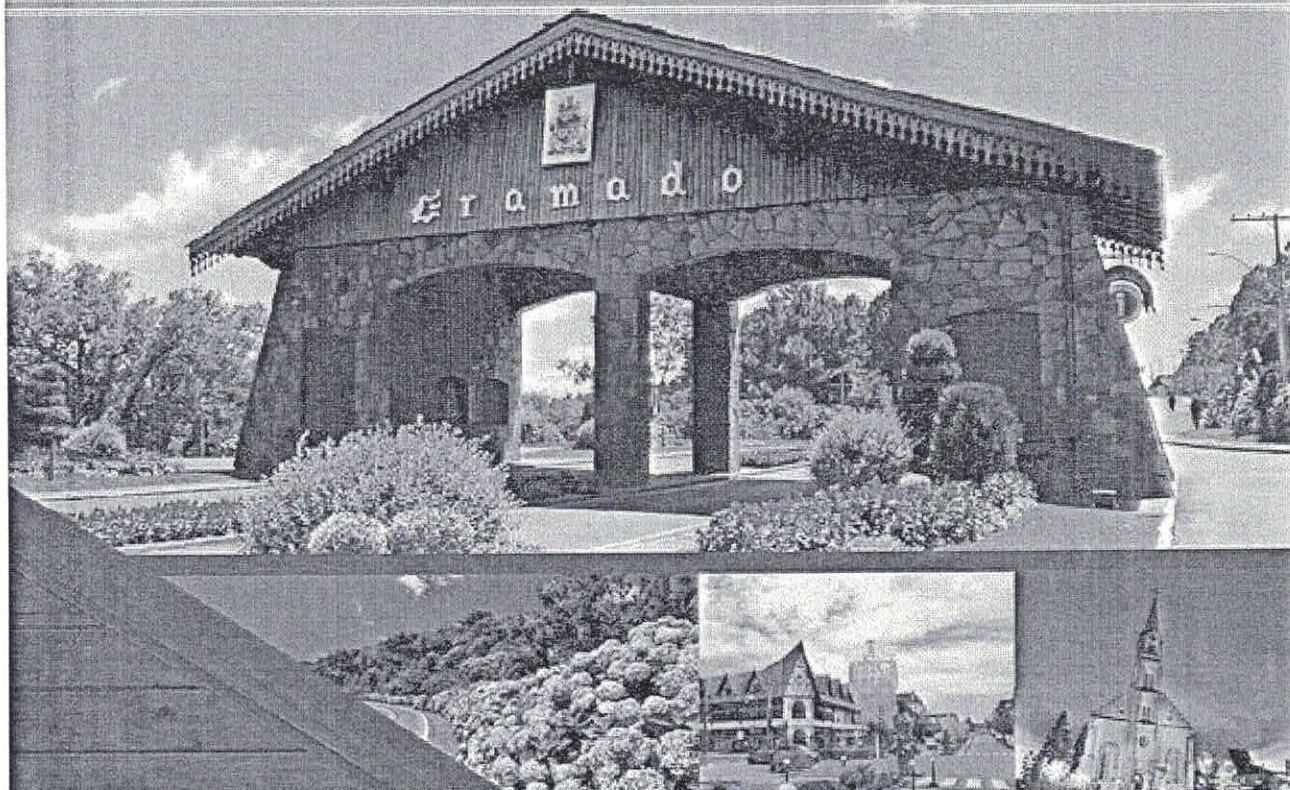


VI CONGRESSO LATINOAMERICANO  
E XII CONGRESSO BRASILEIRO DE  
**HIGIENISTAS  
DE ALIMENTOS**

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZONÓSES  
IV ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO  
DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

TRABALHOS APRESENTADOS  
GRAMADO, RS, BRASIL  
23 A 26 DE ABRIL DE 2013

OS ALIMENTOS SOB A ÓTICA DA SUSTENTABILIDADE:  
ENTRE A CONSCIÊNCIA E A PRÁTICA





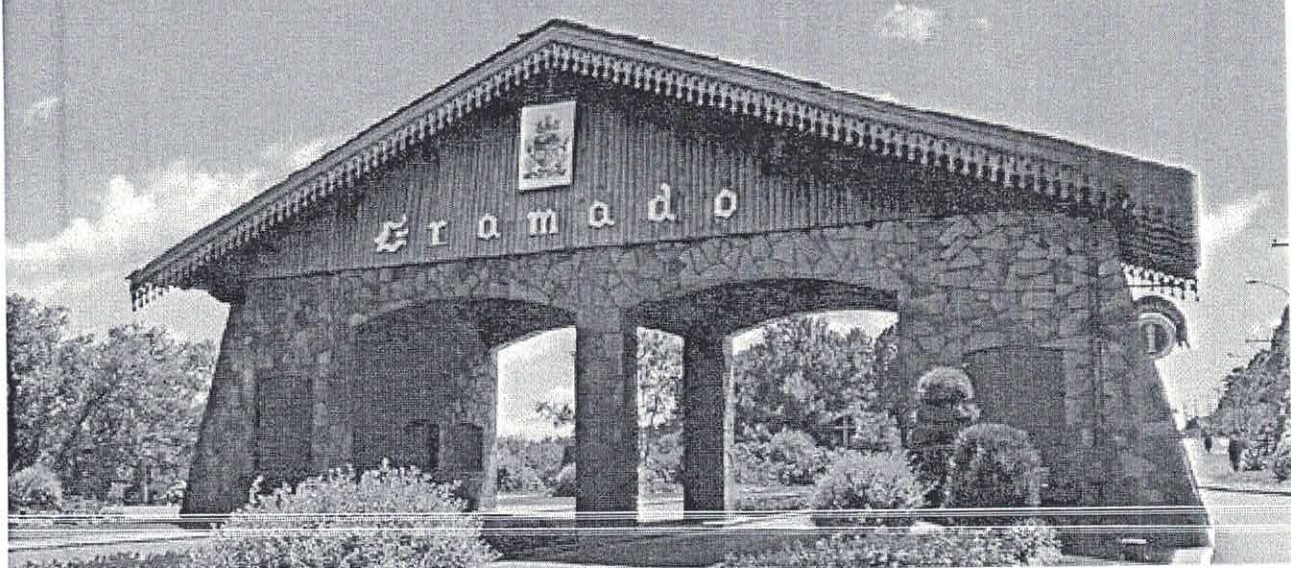
VI CONGRESSO LATINOAMERICANO  
E XII CONGRESSO BRASILEIRO DE  
**HIGIENISTAS  
DE ALIMENTOS**

**23 a 26**  
Abril de 2013

Hotel Serrano Resort  
Gramado - RS

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZOOSE  
IV ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO  
DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

**OS ALIMENTOS SOB A ÓTICA DA SUSTENTABILIDADE:  
ENTRE A CONSCIÊNCIA E A PRÁTICA**



Realização



Organização e  
Operadora de Turismo



Apoio



Ministério da  
Saúde

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



Patrocínio

