



**QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELA ESPECTROFOTOMETRIA UV:  
MÉTODO DE BRADFORD EM LEITE CAPRINO ADULTERADO COM LEITE BOVINO**

**QUANTIFICATION OF TOTAL PROTEINS BY UV SPECTROPHOTOMETRIC:  
BRADFORD ASSAY OF ADULTERATION IN CAPRINE MILK WITH ADICTION OF COW  
MILK**

Alessa Siqueira de Oliveira dos SANTOS<sup>1</sup>, Debora Cristina JESUS<sup>2</sup>, Vaneida Maria MEURER<sup>3</sup>, Antônio Sílvio EGITO<sup>4</sup>, Marco Antônio Moreira FURTADO<sup>3</sup>, Marta Fonseca MARTINS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite

<sup>2</sup>Estudante de Graduação em Zootecnia - UFPR

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Palavras-chave: Leite; Análise de proteínas; Método de Bradford; Espectrofotometria UV.

### Introdução

As proteínas no leite são representadas pelas caseínas e soroproteínas. As caseínas representam cerca de 80% das proteínas totais do leite e são constituídas essencialmente pela  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CAS),  $\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CAS),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CAS) e  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CAS). As soroproteínas representam cerca de 20% das proteínas totais do leite sendo constituídas principalmente pela  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), soroalbumina e imunoglobulinas em menores quantidades as quais se encontram solúveis (DALGLEISH & MORRIS, 1988). Muitos estudos mostram que a quantificação de proteína é muitas vezes necessária antes de processar as amostras de proteína para o isolamento, a separação e a análise por métodos cromatográficos, eletroforéticos e imunológicos em diversas áreas do conhecimento.

No doseamento das proteínas totais do leite e produtos lácteos os métodos mais utilizados são o método de Kjeldahl (HELDRICH, 1990), os métodos por fixação de corante (principalmente o Negro de Amido) e a espectrofotometria no infravermelho (IV) e ultravioleta (UV). Os métodos espectrofotométricos são os mais utilizados (GROVES et al., 1968). A espectrofotometria no UV apresenta vantagem de não destruir as amostras e ser bastante rápido (PACE et al., 1995). Porém, algumas amostras complexas, por possuírem substâncias distintas, podem absorver na região do ultravioleta tornando os resultados pouco precisos (STOSCHECK, 1990). O método que realiza ligação do corante Coomassie Brilliant Blue (CBB) às proteínas, conhecido como método de Bradford é comumente utilizado para determinação de proteínas em alimentos (BRADFORD, 1976). Este método é baseado na absorção de luz produzida pelo resultado da interação entre o corante CBB e as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais e aromáticas. Em pH baixo, a forma vermelha do corante é convertida na forma azul quando ocorre a interação entre proteínas de alto peso molecular e o CBB, provocando o deslocamento do equilíbrio do corante para forma aniônica absorvendo fortemente na região de 595 nm. Esta técnica é muito reproduzível e rápida com relativa sensibilidade e especificidade (ZOR & SELINGER, 1996). A vantagem do método de Bradford é que 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, a interação dos anéis aromáticos do reagente com anéis aromáticos dos aminoácidos, como o triptofano, e finalmente, a interação fraca do reagente com aminoácidos polares que tem grupamentos R hidrofóbicos, tais como anel aromático da tirosina (COMPTON & JONES, 1985; SPLITTGERBER & SOHL, 1989; OWUSU-APENTEN, 2002).

Existem muitos estudos para a determinação de proteínas comparando sensibilidade, custos, robustez, interferentes e linearidade dos diferentes métodos espectrofotométricos, mas não foram encontrados na literatura especializada estudos comparativos da linearidade do método de Bradford para quantificação de proteínas totais em misturas de leite de

SP 6080  
P. 200

diferentes espécies. A Legislação do Ministério da Agricultura (Art. 879 RIISPOA) considera um tipo de adulteração o emprego de substâncias de qualquer qualidade tipo e espécies diferentes da composição normal do produto sem prévia autorização do D.I.P.O.A. A legislação julga como fraude as operações de manipulações e elaborações executadas com a intenção deliberada de estabelecer falsa impressão aos produtos fabricados.

A adulteração e fraude no leite de cabra além de poder prejudicar as particularidades de queijo que utilizam a matéria prima de leite caprino, podem causar grandes danos à saúde de crianças em tratamentos de alergia ao leite de vaca.

Considerando que a mistura do leite de espécies diferentes é um tipo de fraude, o presente trabalho se propôs a avaliar através da linearização da curva de calibração obtida pela proteína padrão do leite ( $\beta$ -CAS) a quantificação das proteínas totais em amostras de leite de cabra fraudadas com porcentagens crescentes de leite bovino (0; 2; 4; 6; 8; 10; 50 e 100% v/v) utilizando o método de Bradford com leitura no UV.

### Material e métodos

Preparação das simulações de fraudes de leite caprino com leite bovino: o leite cru de caprinos da raça Saanen foi coletado de um animal e mantido em refrigeração. Da mesma forma, procedeu-se a coleta do leite bovino da raça Holandesa. No laboratório, os leites das duas espécies foram misturados em diferentes proporções observando as seguintes concentrações: 0; 2; 4; 6; 8; 10; 50 e 100% v/v, sendo que 0% corresponde ao leite de cabra puro e 100% o leite de vaca puro.

Preparação da curva de calibração com a proteína padrão: a solução do reagente Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Hercules, Califórnia) foi preparada conforme preconização do fabricante. A proteína padrão  $\beta$ -CAS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram preparadas em seis diluições em água ultra pura (Ultrapure Milli-Q; Millipore Corp., Bedford, MA, USA), com as seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL. Considerando o método regular conforme recomendação do fabricante, as amostras foram preparadas na proporção de 1:50, pipetou-se 4  $\mu$ L de cada diluição das proteínas padrão em microtubos e adicionou 200  $\mu$ L do reagente Bradford com posterior agitação no vórtex. Após 5 minutos, as medidas de absorbâncias a 595 nm foram realizadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Technologies, Wilmington, USA) no módulo "Protein Bradford" utilizando somente o reagente Bradford como branco.

Determinação espectrofotométrica das proteínas totais do leite: foram utilizadas simulações de amostras de leite de caprino fraudadas leite bovino cru proveniente de vaca Holandesa na diluição de 1:50 com água ultra pura. Em seguida, adicionou-se 4  $\mu$ L da diluição em 200  $\mu$ L do reagente Bradford e posterior agitação no vórtex. Após 5 minutos, as medidas de absorbâncias a 595 nm foram obtidas no espectrofotômetro ultravioleta utilizando somente o reagente Bradford como branco. Dada as concentrações das amostras pelo software do espectrofotômetro foi utilizado o programa Excel para produzir a curva de calibração e determinar o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ).

### Resultados e Discussão

Os sinais de absorbância obtidos por determinação espectrofotométrica por ultravioleta foram correlacionados com as concentrações da proteína padrão resultando na curva analítica de calibração, a qual gerou uma equação de regressão linear:  $Y=0,0277x+0,0003$  com coeficiente de correlação maior que 0,98, mostrando linearidade do método para estimar a quantidade de proteína das amostras testadas.

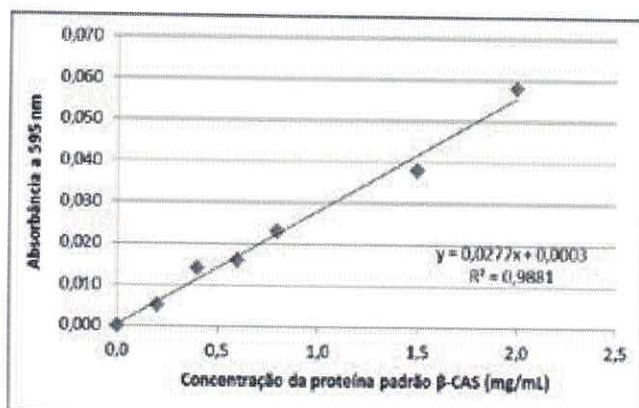


Figura 1. Curva de calibração com a proteína padrão  $\beta$ -Caseína

A tabela 1 evidencia os resultados quantitativos pelo método de Bradford da concentração da proteína total quantificada no espectrofotômetro e estimada através da equação de regressão linear com coeficiente de correlação linear acima de 0,98.

| Amostras de leite (mg/mL)     | Concentração de proteína total ( $\mu$ g/mL) quantificada no espectrofotômetro | Concentração de proteína ( $\mu$ g/mL) estimada |
|-------------------------------|--|---|
| Leite Cru de Cabra Individual | 1005,2   | 1028,88   |
| Leite de Cabra (*2%)          | 1732,6   | 1787,00   |
| Leite de Cabra (*4%)          | 1397,24  | 1440,43   |
| Leite de Cabra (*6%)          | 1569,8   | 1613,72   |
| Leite de Cabra (*8%)          | 1812,76  | 1859,21   |
| Leite de Cabra (*10%)         | 1493,56  | 1534,30   |
| Leite de Cabra (*50%)         | 1749,12  | 1801,44   |
| Leite Cru de Vaca Individual  | 1694,16  | 1743,68   |

Tabela 1. Quantificação por espectrofotometria UV (Método de Bradford) das proteínas totais de leite de cabra adulterado com leite de vaca em diferentes concentrações. \*Porcentagem de Adição Leite de Vaca

De acordo com os dados expostos na tabela 1, a quantificação de proteínas totais ( $\mu$ g/mL) aumentou com a adição do leite de vaca a partir de 2% quando comparada a concentração observada no leite puro de cabra, porém o aumento da concentração das proteínas totais não apresentou linearidade crescente mediante a porcentagem crescente de fraude. A concentração obtida para o leite cru de vaca resultou em 68% a mais que a concentração do leite de cabra, o que pode ser explicado pela literatura de GREPPI et al. 2008 quando descreve que a composição das proteínas totais do leite de vaca possui concentração entre 32-34 g/L versus 28-32 g/L do leite de cabra. As proteínas do soro correspondem 5.8-6.5 g/L do leite de vaca e 5.5-6.5 do leite de cabra. As frações de caseínas são as maiores representantes da proteína totais com 26-37 g/L do leite de vaca e 22-28 g/L do leite de



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

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILANCIA DAS ZOOZOSES  
IV ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO  
DE INSPECÇÃO 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

cabra. Um grande número de estudos científicos demonstra que a proteína do leite de 200 espécies de mamíferos pode variar de 1% até 20% (GREPPI et al., 2008). Essa variação pode ser explicada pela diferença de genótipos de cada espécie e raça, período de lactação, saúde do animal, alimentação, intervalo entre as ordenhas, estação do ano e clima.

O leite de cabra vem sendo muito utilizado devido suas propriedades bioquímicas de melhor digestibilidade e menor alergenicidade comparado ao leite bovino (RIBEIRO & RIBEIRO, 2001), por isso a mistura de leite e/ou proteínas lácteas de diferentes espécies se torna um grande problema de saúde pública. As importantes propriedades do leite caprino gera um aumento da demanda do produto. Portanto é preciso investimentos da indústria e políticas públicas em produção de tecnologia e maior fiscalização da composição desse tipo de produto para proporcionar maior segurança aos consumidores.

### Conclusão

O método de Bradford mostrou eficiência para quantificação de diferentes concentrações de proteínas totais de leite de cabra e do leite de vaca. Portanto essa técnica de espectrofotometria pode ser utilizada como um método preliminar, auxiliando outros métodos convencionais de análise de fraude de leite de cabra adulterado com leite de vaca, prática de caráter fraudulenta incentivada pelas flutuações sazonais na disponibilidade do leite de cabra e de ovelha e o preço mais elevado comparativamente ao leite de vaca.

### Referências Bibliográfica

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, 72, 248-254, 1976.

COMPTON, S.J., JONES, C.G. **Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay.** Analytical Biochemistry, 151, 369-374, 1985.

DALGLEISH, D. G., MORRIS, E.R. **Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles.** Food Hydrocolloids, Oxford, 2, 311-320, 1988.

GREPPI, G. F. et al. (2008) **Protein Components of Goat's Milk.** Disponível em: <http://bionanotech.uniss.it/wp-content/uploads/2011/09/15-Roncada-Greppi.pdf>. Acesso em: 26 novembro 2012.

GROVEZ, W. F., DAVIES, J. F. C., SELLS, B. H. **Spectrofotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference.** Analytical Biochemistry, 22, 195-210, 1968

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

OWUSU-APENTEN, R. K. **Food Protein Analyses: Quantitative effects on processing.** New York, NY, USA: Taylor & Francis, 2002

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMLEY, G.; GRAY, T. **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.** Protein Science, vol. 4, issue 11, p. 2411-2423, 1995.

SPLITTGERBER, A., SOHL, J. **Nonlinearity in Protein Assays by the Coomassie Blue Dye-Binding Method.** Analytical Biochemistry, 179, 198-201, 1989.

STOSCHECK, C. M. **Quantitation of proteins.** In Deutscher M. P. (Ed.). **Methods in Enzymology.** 182, p. 50-69 New York, NY, USA: Academic Press Inc, 1990.



ZOR, T., SELINGER, Z. **Linearization of the Bradford Protein Assay Increases its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies.** Analytical Biochemistry, 236, 302-308, 1996.

RIBEIRO, E. L. A., RIBEIRO, H. J. S. S. **Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra.** Semina: Ci. Agrárias, Londrina, v. 22, n.2, p. 229-235, jul./dez. 2001

BRASIL. Decreto nº 30.691 de 29 de março 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/requisitos-sanitarios>. Acesso em: 11 dezembro 2012.

# Higiene

março/abril 2013

Volume 27 - nº 218/219

ENCARTE ELETRÔNICO

ISSN (0101-9171)

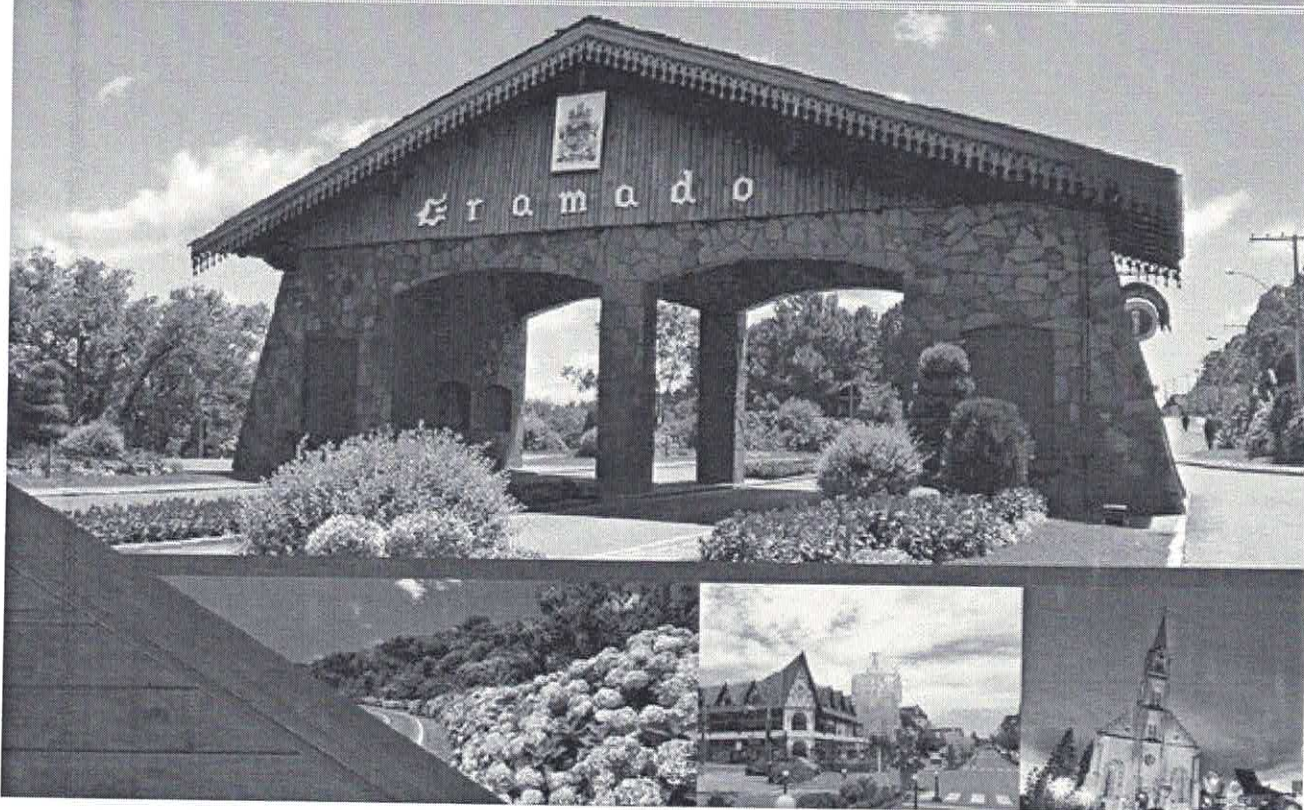


VI CONGRESSO LATINOAMERICANO  
E XII CONGRESSO BRASILEIRO DE  
**HIGIENISTAS  
DE ALIMENTOS**

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZOOSES  
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

II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZOOSESES

IV ENCONTRO DO SISTEMA BRASILEIRO  
DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

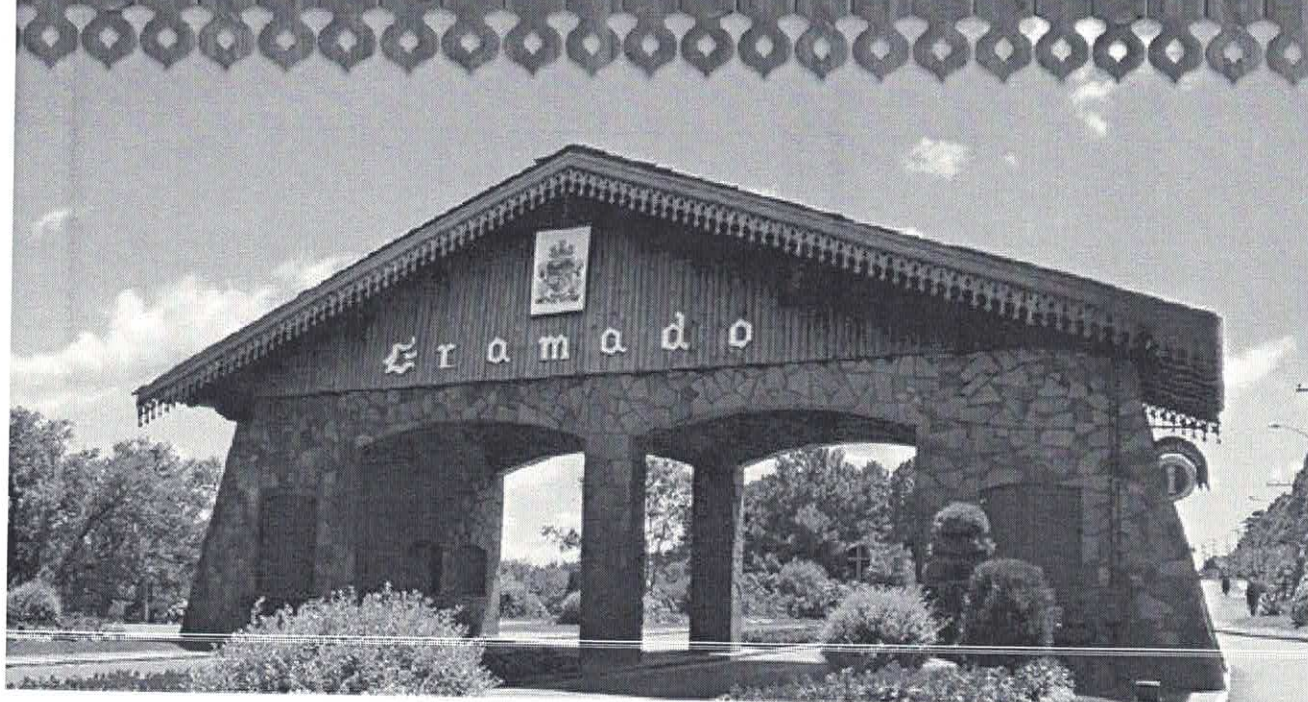
23 a 26

Abril de 2013

Hotel Serrano Resort

Gramado - RS

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



Realização



Organização e  
Operadora de Turismo



Apoio



Ministério da  
Saúde

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



Patrocínio

