

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G EM LEITE, CREME, MANTEIGA E
LEITELHO PELO MÉTODO GRAVIMÉTRICO**

JULIANA SOARES LIMA

**MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

JULIANA SOARES LIMA

**OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G EM LEITE, CREME, MANTEIGA E
LEITELHO PELO MÉTODO GRAVIMÉTRICO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Leorges Moraes da Fonseca

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2017**

L732o

Lima, Juliana Soares, 1982-

Obtenção de imunoglobulina G em leite, creme, manteiga e leiteiro pelo método gravimétrico / Juliana Soares Lima. – 2017.

45 p. : il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Proteínas – Teses. 3. Gordura do leite – Teses.
4. Imunoglobulina G – Teses. 5. Eletroforese – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

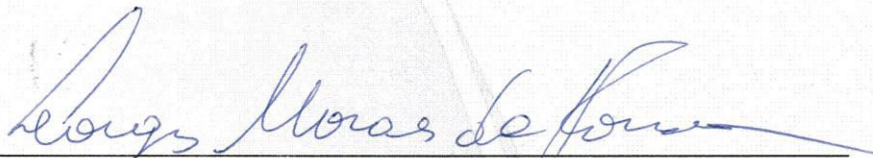
CDD – 637

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA SOARES LIMA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

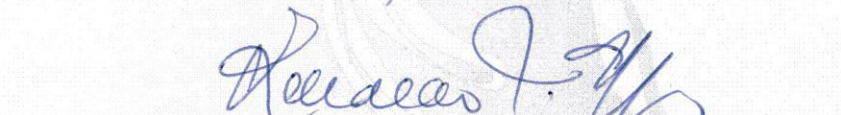
Aprovada em 07 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Georges Moraes da Fonseca
Presidente - Orientador



Prof^a. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Renaldo Travassos Martins
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por nunca me deixar desistir, me guiando sempre pelo caminho correto, da dedicação, do respeito e da fé.

Aos meus pais, grandes incentivadores da minha trajetória profissional. Agradeço por acreditarem nas minhas escolhas, pelo apoio e pelo amor integral. São meus exemplos de trabalho, responsabilidade e honestidade.

Aos meus irmãos, cunhadas e meus sobrinhos, Davi e Lucas, que me faziam sempre querer voltar pra casa pra ganhar mais amor.

À Tia Corina e primos, por serem minha família em BH, me recebendo com tanto carinho.

Ao professor e orientador Leorges Moraes da Fonseca, portador de grande conhecimento técnico, acadêmico e de vida, agradeço pelo apoio, compreensão e pela confiança depositada em mim.

À Daniela Teixeira e Dimitri, por me receberem tantas vezes em sua casa, depois de dias difíceis e serem os melhores amigos sempre.

Aos amigos conquistados durante o curso, principalmente, Daniela Solo, Wanessa, Érika e Letícia pelo carinho, amizade e pelos momentos de alegria e descontração. Vocês fizeram a caminhada ser mais alegre.

Ao meu grande incentivador e amigo Jardel Lopes, por acreditar em mim.

Às Professoras Mônica Pinho e Mônica Leite, pelo apoio e por terem aceitado fazer parte da banca examinadora.

Ao Professor Ronon, que em um único dia em que me ajudou a ligar um equipamento, me deu uma aula de vida, que nunca vou esquecer.

Ao Marco Antônio e ao Luigi, por me ajudarem nas análises, vocês foram essenciais.

À Grazielle, do Laboratório de Virologia, por ser tão paciente e persistente, e não ter me deixado desistir. Muito obrigada!

Aos meus parentes e amigos que participaram comigo dessa caminhada.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa.

Apoio financeiro: FAPEMIG CVZ - APQ-01179-14; CNPq PQ-2 309801/2014-1; FUNDEP/LabUFMG

*A Ana Paula, minha eterna amiga,
que sonhou junto comigo esse
mestrado, mas que não pode estar
aqui ao meu lado para
acompanhar a realização desse
sonho, dedico.*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	15
3.2 PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	17
3.3 IMUNOGLOBULINAS.....	19
3.4 ANÁLISE DE PROTEÍNAS - ELETROFORESE.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	21
4.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	22
4.3 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO LEITE.....	22
4.4 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS.....	25
4.5 ANÁLISES DE PERFIL PROTÉICO POR ELETROFORESE.....	25
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA.....	27
5.2 PERFIL PROTEICO - ELETROFORESE.....	31
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXO	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de Gordura (g/100g) do leite desnatado obtido a partir do desnate centrífugo em desnatadeira e do leite desnatado obtido após repouso sob refrigeração por 24h (n=4).....	27
Tabela 2. Resultado médio das análises físico químicas do leite cru e pasteurizado.....	28
Tabela 3. Resultado médio das análises físico químicas do leite desnatado.....	28
Tabela 4. Resultado médio das análises físico químicas do creme de leite.....	29
Tabela 5. Resultado médio das análises físico químicas da manteiga.....	29
Tabela 6. Resultado médio das análises físico químicas do leiteiro.....	30
Tabela 7. Detecção de imunoglobulinas pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida em leite, leite desnatado/semidesnatado, creme de leite, manteiga e leiteiro utilizando-se o <i>software Image J</i>	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição centesimal média do leite de vaca.....	15
Quadro 2. Distribuição das principais proteínas de soro de leite bovino.....	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações na concentração de Proteínas totais (▲), caseína (●) e proteínas do soro (■) do leite bovino durante o início da lactação.....	16
Figura 2. Esquema experimental: Quatro repetições.....	24
Figura 3. Equipamento para eletroforese modelo BIO RAD.....	26
Figura 4. Gráficos gerados pelo programa <i>Image J</i> e gel de eletroforese SDS – PAGE a 8% com mudança na coloração para leitura no software para creme de leite.....	33
Figura 5. Gráficos gerados pelo programa <i>Image J</i> e gel de eletroforese SDS – PAGE a 8% com mudança na coloração para leitura no software para manteiga.....	34
Figura 6. Gráficos gerados pelo programa <i>Image J</i> e gel de eletroforese SDS – PAGE a 8% com mudança na coloração para leitura no software para leiteiro.....	35

RESUMO

As proteínas do leite são conhecidas pelo seu alto valor nutricional, incluindo propriedades funcionais amplamente exploradas pelas indústrias de alimentos. O presente estudo teve por objetivo desenvolver um método de obtenção de leite e derivados (leite, creme, manteiga e leitelho) ricos em imunoglobulina por meio da separação de fases por gravidade e verificar a partição de imunoglobulinas nestes produtos. A detecção de imunoglobulinas foi realizada pelo perfil eletroforético das proteínas usando a técnica de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Com o método utilizado foi possível identificar a concentração de imunoglobulina na porção gordurosa do leite que permaneceu em repouso durante 24 horas a 4°C, em contraste com o creme obtido por meio de desnatadeira centrífuga. No creme do leite cru obtido pelo desnate por centrifugação encontrou-se 1,56% de IgG, no creme do leite cru após separação por gravidade encontrou-se 4,46%, no creme do leite pasteurizado do desnate por centrifugação obteve-se 0,60% e no creme do leite pasteurizado após separação por gravidade 8,14% de IgG. Após a inversão de fase do creme, a partição de imunoglobulina ocorreu na manteiga e no leitelho. Portanto, é possível obter fração de creme com maior concentração de imunoglobulina, sendo necessários estudos adicionais para processamento em escala.

Palavra chave: leite, Imunoglobulinas, proteínas, gordura, eletroforese.

ABSTRACT

Milk proteins are known for their high nutritive value and functionality. The objective of the current study was the development of a method to obtain milk and derivatives fractions with high immunoglobulin concentration, based on gravity (milk, cream, butter and buttermilk). Immunoglobulin detection was done by SDS-PAGE. The richest fraction of Immunoglobulin was found in cream after gravity separation from raw milk at 4°C during 24 h, compared to the cream obtained by centrifuge separation. In the cream of the raw milk obtained by the centrifuge separation was found 1,56% of IgG, in the cream of the raw milk kept 24 hours without agitation, was 4,46%. The cream obtained using centrifuge separation from pasteurized milk contained 0,60% of IgG, while cream obtained from pasteurized after 24 hours without agitation was 8,14%. After cream phase inversion, immunoglobulin partition occurred in the butter and whey butter. Therefore, it is possible to obtain cream fraction with high immunoglobulin concentration, but further studies are necessary for process scale up.

Key words: milk, immunoglobulin, proteins, fat, electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza e o único que supre as necessidades dos recém-nascidos de cada espécie nos primeiros meses de vida. É excelente fonte de proteína, gordura, carboidratos e minerais bem como componentes imunomoduladores, incluindo as imunoglobulinas (Igs) (Cakebread, 2015). A composição e características do leite são de grande importância para se produzir derivados lácteos de boa qualidade e consequentemente melhorar o rendimento econômico na indústria de laticínios.

Com o advento de novas tecnologias, particularmente as tecnologias de membranas e com novas descobertas sobre a importância e a funcionalidade das proteínas do leite tem havido um forte incremento das pesquisas procurando intensificar o uso destas proteínas (Bounous, 1997).

As proteínas do leite são classificadas em três frações nitrogenadas: caseínas, que representam a maior parte dos constituintes (78%); soro de leite ou proteínas séricas (17%) e a fração de nitrogênio não proteico (5%). Também fazem parte da fração proteica do leite, as membranas proteicas dos glóbulos de gordura, assim como uma grande variedade de enzimas e hormônios (Sgarbieri, 2004).

Dentre as proteínas séricas, incluem-se α -lactalbumina, β -lactoglobulina, soroalbumina e as imunoglobulinas. No soro de leite bovino predomina a β -lactoglobulina, que praticamente não ocorre no leite humano (Sgarbieri, 2004). As caseínas e proteínas do soro são amplamente utilizadas devido ao seu valor nutricional, ampla aplicação industrial e baixo valor econômico (Sgarbieri, 2005). As proteínas do soro, β -Lg (beta-lactoglobulina), α -La (alfa-lactalbumina), BSA (albumina de soro bovino), imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase apresentam propriedades potencialmente imunomoduladoras. Estas podem ser aproveitadas com grande vantagem em produtos nutracêuticos ou antimicrobianos (Marques *et al.*, 2009).

As proteínas do soro do leite geralmente são obtidas em laboratório ou na indústria a partir da produção de queijos. O soro possui diversas aplicações, sendo utilizado como matéria-prima para vários produtos, entre eles, soro em pó, proteína do soro, ricota, lactose, ácido láctico e alimentos como concentrado proteico (CPS) e isolado proteico do soro (IPS), podendo estes serem obtidos com baixo custo (Pacheco, 2005).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais, razão pela qual alguns pesquisadores classificaram essas proteínas como proteínas de metabolização rápida (*fast metabolizing proteins*), muito adequadas para situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (Sgarbieri, 2004). As principais funções biológicas dessas proteínas incluem: reparação celular, construção e reparação de músculos e ossos, geração de energia, essencial para quem pratica atividades físicas, além de outros benefícios que estão ligados a processos metabólicos do corpo, como atividade imunestimulante, proteção ao sistema cardiovascular e atividade antimicrobiana e antiviral (Fox, 1998; Sgarbieri, 2005).

De acordo com Sgarbieri (1996), o colostro bovino, primeiro produto da glândula mamária é muito rico em proteínas (19,20%), sendo 2,6% de caseína e 16,6% de imunoglobulinas. Existem muitos produtos alimentares funcionais baseados em produtos lácteos incluindo produtos à base de colostro, valorizados pelo seu alto conteúdo de IgG (Cakebread, 2015). Entretanto, a separação de Igs do leite ainda é um processo difícil de ser obtido comercialmente.

Uma das principais características do leite de vaca quando armazenado a frio e sem agitação é a rápida ascensão dos glóbulos de gordura e formação de uma camada de creme na sua superfície (Euber e Brunner, 1984). Esse processo era muito utilizado para obtenção de gordura antes da invenção da desnatadeira (Ma e Barbano, 2000), e ainda é usado em alguns laticínios, por exemplo no norte da Itália, para produção de queijo.

Na indústria, a desnatadeira resolveu o problema de transformar um processo descontínuo de desnate com baixo rendimento, em um processo contínuo de máximo rendimento. Entretanto, o processo descontínuo tem sido investigado nos últimos anos por causa da possibilidade da remoção de alguns elementos do leite, a exemplo das células somáticas e de microrganismos (Ma e Barbano, 2000) e, potencialmente, de imunoglobulinas.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um método de obtenção de imunoglobulinas do leite por meio de separação por gravidade, inversão de fase de emulsão gordura/água e concentração;

- Quantificar as frações com maior teor de imunoglobulinas;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

O leite possui vários componentes como gordura, proteínas, carboidratos, pequenas quantidades de minerais, substâncias hidrossolúveis, traços de enzimas e água, sendo esta o componente mais abundante (Tronco, 2010). A composição do leite (Quadro 1) varia de acordo com a espécie, raça, idade, individualidade, alimentação, tempo de gestação, intervalo entre ordenhas, e muitos outros fatores (Fox, 1998; Taffarel *et al.*, 2015).

Quadro 1. Composição centesimal média do leite de vaca

Constituinte	Teor % (m/m)
Água	85,4 – 87,7
Gordura	3,4 – 5,1
Proteínas	3,3 – 3,9
Lactose	4,9 – 5,0
Cinzas	0,68 – 0,74

Fonte: Swaisgood (1996).

O teor de água dos produtos lácteos varia de 2,5 a 94% e geralmente é o componente principal em peso na maioria dos produtos lácteos. O teor de umidade dos produtos incluindo leite, creme, sorvete, iogurte e a maioria dos queijos, juntamente com a temperatura e o pH, são de grande importância para a tecnologia de alimentos (Fox, 1998).

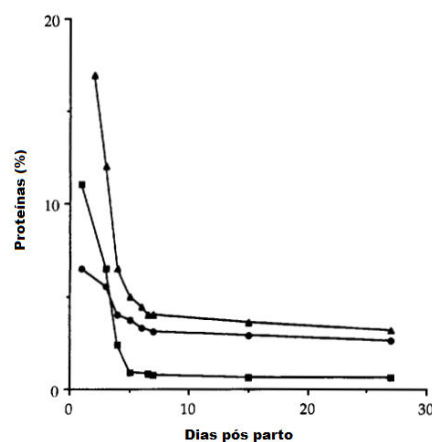
A maior variabilidade composicional do leite é exibida pela fração lipídica. Devido ao valor econômico da gordura do leite, os criadores selecionam os animais que produzem leite com maior porcentagem deste constituinte (Swaisgood, 1996). A gordura do leite é formada na sua maior proporção por triglicerídeos (97-98%) (Tronco, 2010), enquanto o restante são pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres, fosfolípidios, entre outros componentes. O tamanho do glóbulo de gordura no leite é de aproximadamente 2-10µm de diâmetro

(Swaisgood, 1996). Os glóbulos de gordura encontram-se protegidos por uma fina membrana de natureza proteica, na qual ficam associados fosfolipídios, proteínas e outras substâncias. A homogeneização destrói parcialmente essa membrana protetora, o que provoca maior sensibilidade da gordura aos processos de hidrólise e oxidação (Tronco, 2010).

A lactose é um carboidrato encontrado somente no leite (Swaisgood, 1996), sendo uma importante fonte de energia. A lactose encontra-se em solução verdadeira na fase aquosa do leite. Trata-se de um dissacarídeo formado por glicose e galactose (Tronco, 2010). A concentração de lactose no leite varia devido a fatores como raça, fatores de individualidade, inflamação e infecção do úbere e, principalmente, devido a fase da lactação, momento em que a lactose pode diminuir progressivamente e significativamente (Fox, 1998).

O leite bovino contém cerca de 3,5% de proteína. A concentração aumenta durante a lactação, especialmente durante os primeiros dias pós-parto (Figura 1) (Fox, 1998). As proteínas do leite constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Suas propriedades derivam da composição dos aminoácidos que atendem a maioria das exigências fisiológicas do ser humano (Sgarbieri, 2005). Estas proteínas são subdivididas em caseína (80%) e proteínas do soro (20%). A caseína é definida como uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fósforo, podendo ser coagulada pela ação de ácidos, coelho e/ou álcool (Tronco, 2010).

Figura 1. Alterações na concentração de Proteínas totais (▲), caseína (●) e proteínas do soro (■) do leite bovino durante o início da lactação



Fonte: Fox, 1998

3.2 PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

Cerca de 20% da proteína total do leite bovino pertence a um grupo de proteínas geralmente referidas como soro ou proteínas do soro (Fox, 1998). As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem um grau de estabilidade estrutural (Haraguchi *et al.*, 2006). Em comparação com as caseínas, a influência que as proteínas do soro apresentam sobre as propriedades físico-químicas do leite é pequena. Durante o tratamento térmico tornam-se importantes e nas temperaturas superiores a 80° C, as proteínas do soro se desnaturam (Tronco, 2010). As frações do soro podem ser divididas de acordo com a sua concentração em proteínas majoritárias, que correspondem a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas, glico-macropéptídeos (GMP), proteoses e peptonas e proteínas minoritárias como a lactoferrina e a lactoperoxidase (Haraguchi *et al.*, 2006).

A β -lactoglobulina representa aproximadamente 50% do teor total de proteína do soro de leite bovino. Esta proteína se liga ao cálcio e ao zinco e sua sequência apresenta homologia sequencial parcial com determinadas proteínas capazes de ligar retinol (Marques *et al.*, 2009).

A α -lactalbumina representa aproximadamente 25% do teor total de proteína do soro de leite bovino. Setenta por cento da proteína encontrada em leite humano tem as mesmas características da proteína do soro e a α -lactalbumina representa 41% desta fração de proteína. A adição de α -lactalbumina tem sido defendida como forma de humanizar fórmulas infantis e criar outros produtos para pessoas que consomem ou podem ingerir apenas quantidades limitadas de proteínas lácteas (Marques *et al.*, 2009).

A albumina sérica e as imunoglobulinas são consideradas proteínas menores ou secundárias por estarem presentes em quantidades muito pequenas. A albumina sérica liga ácidos graxos e outras moléculas pequenas. As imunoglobulinas incluem IgG1, IgG2, IgM e reforçam a imunidade. As imunoglobulinas são encontradas no colostro em concentrações maiores do que em leite comum (Marques *et al.*, 2009).

As imunoglobulinas, juntamente com a lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima são de grande importância por formarem um sistema antimicrobiano, sendo encontradas no leite e no colostro.

As imunoglobulinas do leite permanecem quase que integralmente no soro e continuam a desempenhar função importante, não somente no sistema gastrointestinal, mas sistematicamente em todo o organismo. IgG, β -Lg, α -La e BSA são proteínas séricas predominantes no colostro e no leite bovino (Sgarbieri, 2004). As quantidades relativas das principais proteínas do soro de leite bovino são mostradas no quadro 2.

Quadro 2. Distribuição das principais proteínas de soro de leite bovino

<i>Proteínas do soro</i>	<i>(g/L)</i>
β-lactoglobulina	3,2
α-lactalbumina	1,2
Imunoglobulinas	0,7
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4
Lactoferrina	0,1
Total	5,6

Fonte: Adaptado de Sgarbieri (2005).

Um dos assuntos mais promissores em relação às proteínas do soro é a capacidade das mesmas em aprimorar as defesas antioxidantes e reduzir a carga de oxidantes do organismo. Mesmo agindo de forma indireta, os compostos do soro, como imunoglobulinas, enzimas (lisozima e lactoperoxidase) e lactoferrina participam da imunidade passiva contra infecções no lúmen intestinal, como também podem contribuir para a redução de cargas oxidantes geradas durante os processos inflamatórios (Marques *et al.*, 2009)

Alguns autores relataram em suas pesquisas que as proteínas do soro ácido possuem atividades anticancerígenas em humanos (Marques, *et al.* 2009) e que as fontes proteicas α -lactalbumina e β -lactoglobulina podem ser eficazes no retardamento do câncer de cólon em ratos jovens (Prates, 2002). Os pesquisadores Stott e Lucas (1989) sugeriram que as imunoglobulinas, obtidas a partir do "pool" do leite de vacas, exercem melhor efeito contra vários patógenos do que o colostro de apenas uma vaca.

Estudos realizados por McIntosh *et al.* (1995), McIntosh *et al.* (1998) e McIntosh e Le (2001) indicam que as proteínas do soro atuaram de maneira mais eficaz contra o aparecimento e crescimento de tumores de cólon induzidos em roedores do que as demais proteínas testadas. Por essa razão, a aplicação dessa área de interesse decorre da oportunidade de se obter fração proteica e produtos inéditos com alto potencial de fornecer proteção contra doenças, especialmente em humanos (Sgarbieri, 2004).

3.3 IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas constituem uma família de proteínas de elevado peso molecular e que apresentam propriedades físicas, químicas e imunológicas diversas. Elas ocorrem no soro sanguíneo e em outros fluidos corporais, estando em elevada concentração no colostro e servem para transmitir imunidade passiva aos recém-nascidos (Sgarbieri, 2005).

Existem três tipos de imunoglobulinas presentes no colostro: IgG, IgM e IgA . Cada uma tem uma função: a IgG tem a função principal de identificar e destruir patógenos. A IgM serve como primeira linha de defesa nos casos de septicemia e a IgA protege as mucosas, como a parede do intestino, ligando-se à parede intestinal e evitando a adesão de possíveis patógenos à mucosa (Bolzan *et al.*, 2010).

A estrutura básica de uma imunoglobulina consiste numa estrutura semelhante a Y que tem duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. A molécula de imunoglobulina é mantida em conjunto por duas ligações dissulfeto na região da dobradiça. Uma ligação dissulfeto também liga a cadeia leve e pesada (Parham, 2009). É possível que estas ligações dissulfeto na molécula de imunoglobulina sejam destruídas pelo calor, ocorrendo mudanças conformacionais dentro da molécula de imunoglobulina, fazendo-a perder a sua atividade (Geer, 2014).

A classe de imunoglobulinas G, ou IgG compreende 80-90% do total de imunoglobulinas no início do colostro bovino (cerca de 50 gL^{-1}). A partir da ordenha do primeiro dia após parto, a IgG representa mais de 90% do valor total de Ig (Elfstrand *et al.*, 2002). Essas imunoglobulinas expressam atividades multifuncionais, incluindo lise celular por ativação da sequência do

complemento, melhora a fagocitose de microrganismos, e age ligando-se a locais específicos sobre as superfícies da maioria dos agentes ou produtos infecciosos, inativando-os ou reduzindo a infecção (El-Zahar, 2015). A imunoglobulina G está envolvida na resposta imune secundária e tem mais especificidade em relação a antígenos específicos (Hurley e Theil, 2011).

A imunoglobulina A é o principal anticorpo encontrado nas secreções mucosas. A imunoglobulina M está envolvida na primeira resposta imunitária quando um antígeno é detectado e, portanto, tem menor especificidade (Hurley e Theil, 2011).

O leite é processado em escala industrial em uma ampla gama de produtos de consumo, incluindo leite líquido, iogurtes, queijos, cremes, leite em pó. Como em todos os produtos alimentares manufaturados, a segurança dos consumidores é de suma importância. Para produtos lácteos isso é assegurado principalmente por meio do uso de tratamentos térmicos, com várias combinações de temperatura e tempo prescritas para inativar a deterioração e as bactérias patogênicas no leite cru. O leite também é submetido a aquecimento durante operações, por exemplo, separação, evaporação térmica e secagem por pulverização, dependendo do produto a ser fabricado. Contudo, as imunoglobulinas estão entre as proteínas de leite mais termolábeis. A exposição a operações de calor, pressão ou alteração do pH pode afetar esta proteína e, em última análise, a sua atividade de anticorpos (Cakebread, 2015).

3.4 ANÁLISE DE PROTEÍNAS - ELETROFORESE

O perfil proteico das frações de imunoglobulinas pode ser obtido por metodologias como eletroforese SDS-PAGE. A eletroforese SDS-PAGE é usada para separar misturas complexas de proteínas e também pode servir para purificar as proteínas para utilização em outras aplicações (Gallagher, 2006).

É uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo. Consiste na migração de moléculas ionizadas na mesma direção, as quais se repelem mutuamente mantendo sua estrutura e propriedades intactas, possibilitando assim a separação em várias frações (Brammer, 2001). Nestas análise se usa o detergente dodecil sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”, SDS). Basicamente, a proteína é desnaturada por aquecimento na

presença de 2-mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfeto e os polipeptídios adquirem a carga negativa do SDS. A separação no gel dá-se unicamente pela diferença dos pesos moleculares (Brammer, 2001). Após a montagem do aparato, tanto o topo como a base do gel são imersos em solução tampão apropriado, o qual é importante para manter constante o estado de ionização das moléculas que estão sendo separadas. Qualquer variação no pH pode afetar a carga líquida e portanto a mobilidade da partícula (Wilson, 2010).

Para Sgarbieri (1996), a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS). Por este motivo, tal técnica é também conhecida como SDS-PAGE. A eletroforese é uma técnica que permite a separação de diferentes tipos de proteínas em um suporte que, normalmente, pode ser acetato de celulose, gel de agarose ou em gel de poliacrilamida

A eletroforese em poliacrilamida atua por dois princípios: exclusão molecular, devido à porosidade característica do gel e migração no campo elétrico devido à diferença na densidade de cargas de cada proteína. Em meio alcalino, grande parte das proteínas apresentam cargas negativas e, quando aplicado um campo elétrico, ocorre a migração das mesmas para o polo positivo em diferentes velocidades, dependendo também de suas propriedades físicas, densidade de cargas, tamanho e forma molecular, de modo que torna possível a separação da amostra em diferentes frações proteicas (Sgarbieri, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório Piloto de Laticínios, no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG)¹, no Laboratório de Análises físico-químicas I do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal e no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

¹ Acreditado ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de leite cru, obtidas de tanque de expansão, foram coletadas na Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé, Minas Gerais durante os meses de agosto a novembro. Foram realizadas quatro repetições, utilizando-se 50 litros de leite em cada repetição, obtidos e distribuídos em dois recipientes, previamente sanitizados com cloro a 200 ppm. Antes da coleta, foi ligado o agitador do tanque por 10 minutos.

4.3 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO LEITE

No Laboratório Piloto da UFMG, 50 litros de leite foram homogeneizados por agitação por 5 minutos. Foram retiradas amostras em duplicata, que foram acondicionadas em frascos com comprimido de bronopol para as análises de composição do leite e contagem de células somáticas (CCS) no equipamento CombiScope FTIR 400® (SomaScope e LactoScope FTIR, Delta Instruments, Drachten, Holanda) e em frascos com comprimido de azidiol para análise de contagem bacteriana total (CBT) no equipamento eletrônico Bactoscan FC® (Foss, Hillerod, Dinamarca). Uma terceira alíquota, sem conservantes, foi coletada em frascos para análise de perfil proteico.

Cerca de 12,5 litros de leite cru foram colocados em recipiente de aço inoxidável e deixado em repouso por 24 horas, em câmara fria a 4°C + 2°C. O restante do leite foi aquecido em tanque de aço inox de camisa dupla. Ao atingir 40°C, 12,5 litros de leite cru foram transferidos para a desnatadeira de inox (Marca Casa das Desnatadeiras - Modelo 36-GR), produzindo creme de leite e leite desnatado. O restante do leite (25 litros) foi pasteurizado por 30 minutos à temperatura de 62 - 65°C, sob agitação. Deste leite pasteurizado, 12,5 litros foram colocados em recipiente plástico de 650 mm de altura x 360 mm de largura, previamente higienizado, e deixado em repouso por 24 horas em câmara fria a 4°C + 2°C. Foram retiradas amostras em duplicata, que foram acondicionadas em frascos com comprimido de bronopol para as análises de composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite no equipamento CombiScope FTIR 400® (SomaScope e LactoScope FTIR, Delta Instruments, Drachten, Holanda) e em frascos com comprimido de azidiol para análise de contagem bacteriana total (CBT) no equipamento eletrônico Bactoscan FC® (Foss, Hillerod, Dinamarca). Uma terceira alíquota foi

coletada em frascos sem conservantes, para análise de perfil proteico. Os frascos para análise de perfil proteico foram mantidos congelados até a realização das análises. O restante do leite pasteurizado foi resfriado a 40°C e desnatado, gerando creme obtido do leite pasteurizado e gerando leite desnatado. Foram retiradas amostras em frascos de 40 ml para análises composicionais e análises do perfil proteico para o creme de leite cru e para o creme de leite obtido a partir do leite pasteurizado. Os cremes de leite obtidos foram colocados em frascos identificados, tampados, resfriados e armazenados em geladeira (8°C + 2°C) por 24 horas para posterior produção da manteiga.

Os cremes foram retirados da geladeira e colocados em batedeira comercial para produção de manteiga. A primeira bateção durou aproximadamente oito minutos, para a quebra da emulsão, com a separação do leitelho, que foi coletado em frascos de 40 ml para análises de composição e perfil proteico. Após a retirada do leitelho foi adicionada água gelada potável e microfiltrada (filtro com espessura de 205 µm) para lavagem da manteiga. Esta etapa foi repetida por três vezes, sempre drenando o líquido. Ao final, a manteiga foi malaxada e depois coletada em frascos de 40 ml para análises de composição e perfil proteico. Esse processo foi repetido para o creme de leite obtido a partir do leite cru e para o creme obtido a partir do leite pasteurizado.

Ao final das 24 horas de repouso, foi retirada a fração gordurosa do leite dos recipientes plásticos com auxílio de concha de inox, dentro da câmara fria. Retirou-se um volume correspondente a 10% do volume total do leite na parte superior. Com auxílio de uma pipeta foi feita coleta de uma fração restante do leite, ao fundo do recipiente. As amostras foram coletadas em frascos de 40 ml para análises composicionais e de perfil proteico da fração gordurosa (creme por gravidade) obtida a partir dos leites cru e pasteurizado e do leite desnatado (por gravidade) obtido a partir de leite cru e pasteurizado.

Os cremes obtidos foram colocados em batedeira para produção de manteiga. Após a quebra da emulsão o leitelho foi coletado em frascos de 40 ml para análises de composição e perfil proteico. Após a retirada do leitelho, 300 ml de água gelada foram usados para lavagem da manteiga. Essa operação foi repetida por 3 vezes, sempre drenando o líquido após o período de agitação. Ao final, a manteiga foi malaxada e depois coletada em frascos de 40 ml para análises de composição e perfil proteico. Esse processo foi repetido para o creme de leite obtido a partir de leite cru e para o creme de leite obtido a partir de leite pasteurizado.

Todas as amostras coletadas foram mantidas congeladas até a realização das análises (Figura 2).

Figura 2. Esquema experimental: Quatro repetições



4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises foram realizadas em triplicata, seguindo o que preconiza a IN 68 de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2006). Foi realizada a determinação de gordura, umidade, proteína e acidez titulável. O teor de gordura foi analisado pelo método butirométrico (Método B para análise de creme, Método C para análise de leite desnatado e leite, Método F para análise de manteiga). O teor de proteína foi determinado pelo método de microKjeldahl. Os sólidos totais (EST) foram determinados por diferença entre os componentes sólidos e a umidade, sendo esta determinada pelo método gravimétrico. A acidez titulável foi obtida por titulação com solução Dornic. A avaliação de eficiência do tratamento térmico foi verificada por meio da detecção de atividade das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase. Todas as amostras foram descongeladas logo antes da realização das análises.

4.5 ANÁLISE DE PERFIL PROTÉICO POR ELETROFORESE SDS-PAGE

A análise de perfil proteico foi desenvolvida pela metodologia de eletroforese em gel de poli(acrilamida-sódio) dodecil sulfato (SDS-PAGE), no Laboratório de Virologia no Departamento de Medicina Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), de acordo com a metodologia desenvolvida por Laemmli (1970) e Fonseca (2005), com algumas modificações. O protocolo utilizado está representado no ANEXO 1.

A eletroforese contínua foi realizada em equipamento da BIO-RAD (Mini- PROTEN[®]Tetra System) com uma fonte também da BIO-RAD Modelo Power PAC 300. As placas de corrida continham 10 poços para deposição de amostra em cada.

As amostras foram descongeladas em banho maria a 37°C, por 10 minutos. Foi feita a diluição de 20 µl da amostra (leite e derivados) em 20 µl de água destilada. O microtubo foi homogeneizado em aparelho Vortex e uma alíquota de 10 µl da amostra foi adicionada em microtubo juntamente com 30 µl de Tampão de amostra na concentração de 2x. O microtubo foi colocado em termobloco (VHD) por 10 minutos a 100°C. A SDS- Page foi realizada com gel de separação com gradiente de 8%. Foi feita a aplicação do gel de separação na placa de vidro e aguardou-se a polimerização. Após a polimerização completa, em torno de 30 minutos, foi

aplicado o gel de concentração, preparado a 4%, em cima do gel de separação e colocado o pente plástico para formação dos poços. Após a solidificação e retirada do pente foi feita a montagem da cuba de eletroforese, acrescentando o tampão de corrida até o volume indicado na cuba. O pH do tampão de corrida foi corrigido para 8,3 ($\pm 0,2$). Depositaram-se em cada poço 5 μ l da amostra, além de 5 μ l de Padrão de corrida (BenchMark™) e 5 μ l de padrão de IgG Bovina (SIGMA).

A corrida eletroforética foi realizada a 150 V, com mA livre. A variação da amperagem foi acompanhada durante o processo, diminuindo ao longo do mesmo. O início foi sempre com 40 mA. O aquecimento do sistema também foi observado e a corrida foi realizada até que as amostras alcançassem o final do gel.

Após a corrida realizou-se a desmontagem do equipamento e retirada do gel com auxílio de uma espátula de plástico, o gel foi colocado em Solução de fixação por 20 minutos, seguido por imersão em solução corante por 40 minutos e, finalmente descoloração por 15 horas.

A conservação dos géis foi feita pela secagem dos mesmos entre duas folhas de papel celofane. Após a secagem dos géis suas imagens foram obtidas por um scanner acoplado ao computador. As imagens dos géis foram analisadas pelo *software Image J* (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

Figura 3. Equipamento para eletroforese modelo BIO RAD



4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os teores dos componentes do leite e derivados e perfil proteico foram analisados por meio de estatística descritiva das quatro repetições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA

Pelo processo descontínuo (repouso) a porcentagem de gordura no leite desnatado foi sempre alta, maior que 0,5%, enquanto que na desnatação feita por desnatadeiras centrífugas a porcentagem de gordura que permaneceu no leite desnatado foi menor que 0,5%. Este fato pode ser observado na Tabela 1, que traz os resultados encontrados nas análises de gordura do leite desnatado.

Tabela 1. Teor de Gordura (g/100g) do leite desnatado obtido a partir do desnate centrífugo em desnatadeira e do leite desnatado obtido após repouso sob refrigeração por 24h (n=4)

Amostra	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4
Leite desnatado de leite cru (desnatadeira)	0,13	0,2	0,13	0,17
Leite desnatado de leite pasteurizado (desnatadeira)	0,23	0,2	0,26	0,23
Leite semidesnatado de leite cru (repouso sob refrigeração, 24h)	1,93	1,6	1,76	1,9
Leite semidesnatado de leite pasteurizado (repouso sob refrigeração, 24h)	1,46	2,1	1,3	2,2

Embora no presente estudo a denominação do produto obtido do repouso seja de leite desnatado, segundo a IN 62 (Brasil, 2011) o leite que possui teor de gordura entre 0,6% e 2,9% é considerado leite semidesnatado, então terá que ser denominado de semidesnatado.

A fosfatase alcalina é muito usada na indústria para controlar a pasteurização do leite, pois a desativação desta enzima é tomada como condição de pasteurização eficiente, pois comprova que o leite atingiu temperatura e tempo suficiente para a destruição da bactéria patogênica mais resistente (Ordóñez, 2005). A fosfatase alcalina foi negativa em todas as amostras, indicando

que foram adequadamente pasteurizadas. A prova de peroxidase comprovou que o binômio tempo x temperatura de pasteurização foi adequado.

As médias dos valores encontrados para as análises físico químicas do leite e seus derivados estão apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2. Resultado médio das análises físico-químicas do leite cru e pasteurizado pelo método FTIR.

Componente	Gordura g/100g		Proteína g/100g		Umidade g/100g		Sólidos totais g/100g	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Leite cru	3,71	0,22	3,34	0,12	87,64	0,37	12,36	0,37
Leite pasteurizado	3,79	0,54	3,65	0,20	86,66	0,57	13,34	0,57

DP = desvio padrão

De acordo com a IN 62 (Brasil, 2011) os parâmetros físico-químicos devem estar de acordo com os padrões de qualidade. Para o leite cru o teor de gordura deve ser no mínimo 3,0% e o de proteína total mínimo de 2,9 %. Os valores encontrados estão dentro do padrão da normalidade.

Tabela 3. Resultado médio da composição química do leite desnatado e semidesnatado obtidos por meio de centrifugação por desnatadeira e por repouso

Componente	Gordura (g/100g)		Proteína (g/100g)		Umidade (g/100g)		Sólidos totais (g/100g)		Acidez (g/100g)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Desnatado de leite cru por desnate	0,16	0,03	3,41	0,13	90,37	0,24	9,64	0,24	0,21	0,05
Desnatado de leite pasteurizado por desnate	0,23	0,02	3,79	0,15	89,74	0,52	10,26	0,52	0,18	0,02
Semidesnatado de l. Cru do repouso	1,80	0,15	3,53	0,15	88,88	0,28	11,12	0,28	0,17	0,01
Semidesnatado de l. Past. Do repouso	1,77	0,45	3,69	0,13	87,61	0,57	12,39	0,57	0,18	0,02

Para o leite desnatado como já foi dito anteriormente o teor de gordura não deve ser superior a 0,5% segundo a IN 62 (Brasil, 2011). Quando esse valor está entre 0,6 e 2,9% o leite é considerado semi desnatado. A acidez deve estar entre 0,14 e 0,18%.

Tabela 4. Resultado médio das análises físico químicas do creme de leite obtido por meio de centrifugação por desnatadeira e por repouso

Componente	Gordura		Proteína		Umidade		Sólidos totais		Acidez	
	(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)	
Amostra	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Creme de leite cru por desnate	45,83	3,19	2,02	0,18	38,27	12,53	61,73	12,53	0,13	0,01
Creme de leite pasteurizado por desnate	52,88	4,59	2,00	0,23	41,12	3,09	58,88	3,09	0,24	0,25
Creme de leite cru repouso	18,88	3,43	3,16	0,23	74,73	5,39	25,27	5,39	0,16	0,05
Creme de leite pasteurizado repouso	17,55	3,68	3,36	0,25	76,13	6,20	23,87	6,20	0,12	0,02

O Regulamento de identidade e qualidade do creme de leite, definido pela Portaria 146 (Brasil, 1996) estabelece que o teor de gordura para esse produto deve ser de 20,0 a 49,9%. Cremes de baixo teor, ou semi creme ou leves possuem quantidade de gordura de 10 a 19% e os cremes de alto teor de gordura possuem mais de 50%. A Acidez máxima permitida é de 0,2%. Os cremes de leite que foram obtidos pela desnatadeira apresentaram teor de gordura normal. Já os cremes de leite que foram separados após o repouso são considerados cremes leves. Isso pode ser justificado uma vez que a eficiência de separação do creme pelo processo da desnatadeira é maior do que quando é feito o repouso.

Tabela 5. Resultado médio das análises físico químicas da manteiga obtida por meio de centrifugação por desnatadeira e por repouso

Componente	Gordura		Proteína		Umidade		Sólidos totais	
	(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)	
Amostra	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Manteiga de leite cru	67,88	9,14	1,24	0,32	32,61	6,54	67,39	6,54
Manteiga de leite	69,13	11,61	0,84	0,55	32,05	10,22	67,95	10,22

pasteurizado								
Manteiga de leite cru	76,30	3,84	1,34	0,64	21,62	6,78	78,38	6,78
repouso								
Manteiga de leite	76,72	2,44	1,36	0,41	24,18	5,50	75,82	5,50
pasteurizado repouso								

De acordo com o regulamento de identidade e qualidade da manteiga, definido pela Portaria 146 (Brasil, 1996) o teor de gordura da manteiga deve ser no mínimo de 82%. A média de todas as amostras produzidas está abaixo desse valor por ter sido obtido de um processo laboratorial. A umidade máxima deve ser de 16%. Porém a alteração no teor de gordura também levou a alteração no teor de umidade, com grande variação entre as amostras que pode ser identificado pelo desvio padrão.

Tabela 6. Resultado médio das análises físico químicas do leiteiro obtido por meio de centrifugação por desnatadeira e por repouso

Componente	Gordura		Proteína		Umidade		Sólidos totais		Acidez	
	(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)		(g/100g)	
Amostra	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Leitelho de leite cru	1,54	0,16	3,22	0,32	91,30	5,11	8,70	5,11	0,18	0,04
Leitelho de leite pasteurizado	1,43	0,34	3,15	0,45	89,61	7,53	10,39	7,53	0,19	0,06
Leitelho de leite cru repouso	1,54	0,26	2,57	0,55	91,20	2,62	8,80	2,62	0,18	0,04
Leitelho de leite pasteurizado repouso	1,29	0,18	2,82	0,57	92,31	3,57	7,70	3,57	0,17	0,01

O produto leiteiro não possui padrão de identidade e qualidade na legislação brasileira. Por se tratar de um subproduto da manteiga, utilizou-se como padrão para comparação os padrões de um leite semidesnatado com teor de gordura entre 0,5 a 2,9%. Todos os produtos analisados estavam dentro desse padrão.

O período de repouso de 24 horas a 4°C foi eficiente para separação de imunoglobulinas. Em estudos realizados por Caplan (2013) a separação por gravidade durante 22 h a 4°C produziu separação de gorduras, bactérias e células somáticas. A separação por gravidade é facilitada por glóbulos de gordura maiores e quanto maior o tamanho do glóbulo de gordura, mais elementos presentes no leite serão carreados.

Ma e Barbano (2000) afirmaram que há uma significativa influência entre tempo e temperatura, durante a separação por gravidade, na distribuição dos glóbulos de gordura do leite. Depois de duas horas de repouso já foi possível separar a parte gordurosa, porém foi observado que esse fato ocorreu melhor quando mantido a 15°C do que a 4°C.

5.2 PERFIL PROTEICO – ELETROFORESE

O processo de identificação de imunoglobulinas foi feito através do método de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Para a quantificação utilizou-se o *software Image J*, que elabora um gráfico de acordo com as bandas formadas na imagem do gel. Os valores fornecidos são dados em porcentagem. Conforme pode ser observado na tabela 7, foi possível detectar a presença de imunoglobulinas em todos os produtos. Porém, no creme de leite que foi obtido por armazenagem de leite cru em câmara fria (4°C+2°C), sem agitação, a quantidade de imunoglobulinas foi maior, tanto para o leite cru quanto para o leite pasteurizado, evidenciando dessa forma que as imunoglobulinas são carreadas pela gordura quando armazenado sem agitação.

Tabela 7. Detecção de imunoglobulinas pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida em leite, leite desnatado/semidesnatado, creme de leite, manteiga e leiteiro utilizando-se o *software Image J*.

Produto	Imunoglobulina G (%)			
	Leite cru desnatadeira	Leite cru repouso	Leite pasteurizado desnatadeira	Leite pasteurizado repouso
Leite integral		2,14		2,21
Leite desnatado/semi desnatado	1,48	1,70	1,57	4,25
Creme de leite	1,56	5,46	0,60	8,14
Manteiga	3,82	6,95	5,34	6,19
Leitelho	0	10,12	0	6,49

A separação por gravidade de gordura, células somáticas e bactérias, pode ser possível devido a interações com as imunoglobulinas nativas bovinas (Caplan *et al*; 2013). Euber e Brunner (1984) relataram que as imunoglobulinas nativas no leite estão envolvidas na aglutinação e aglomeração dos glóbulos de gordura, que ocorrem durante a separação por gravidade da gordura do leite. As imunoglobulinas também podem se ligar a bactérias viáveis, esporos e células somáticas, assim como a gordura. A separação por gravidade não só remove parcialmente a gordura, como também pode remover uma alta porcentagem dos microrganismos presentes no leite cru (Ma e Barbano, 2000).

No gel de eletroforese da manteiga foi possível identificar a maior porcentagem das imunoglobulinas no produto do repouso, evidenciando que as imunoglobulinas são carregadas com a gordura. Já no leiteiro foi possível demonstrar que pelo menos parte da fração de imunoglobulina pode ter sido perdida no leiteiro, já que foi possível identificar essa proteína nas repetições de repouso.

As figuras 4, 5 e 6 mostram os gráficos gerados pelo software e o gel que foi utilizado para o produto creme de leite, manteiga e leiteiro, respectivamente.

Figura 4. Gráficos gerados pelo programa *Image J* e gel de eletroforese SDS – PAGE a 8% com mudança na coloração para leitura no software para creme de leite

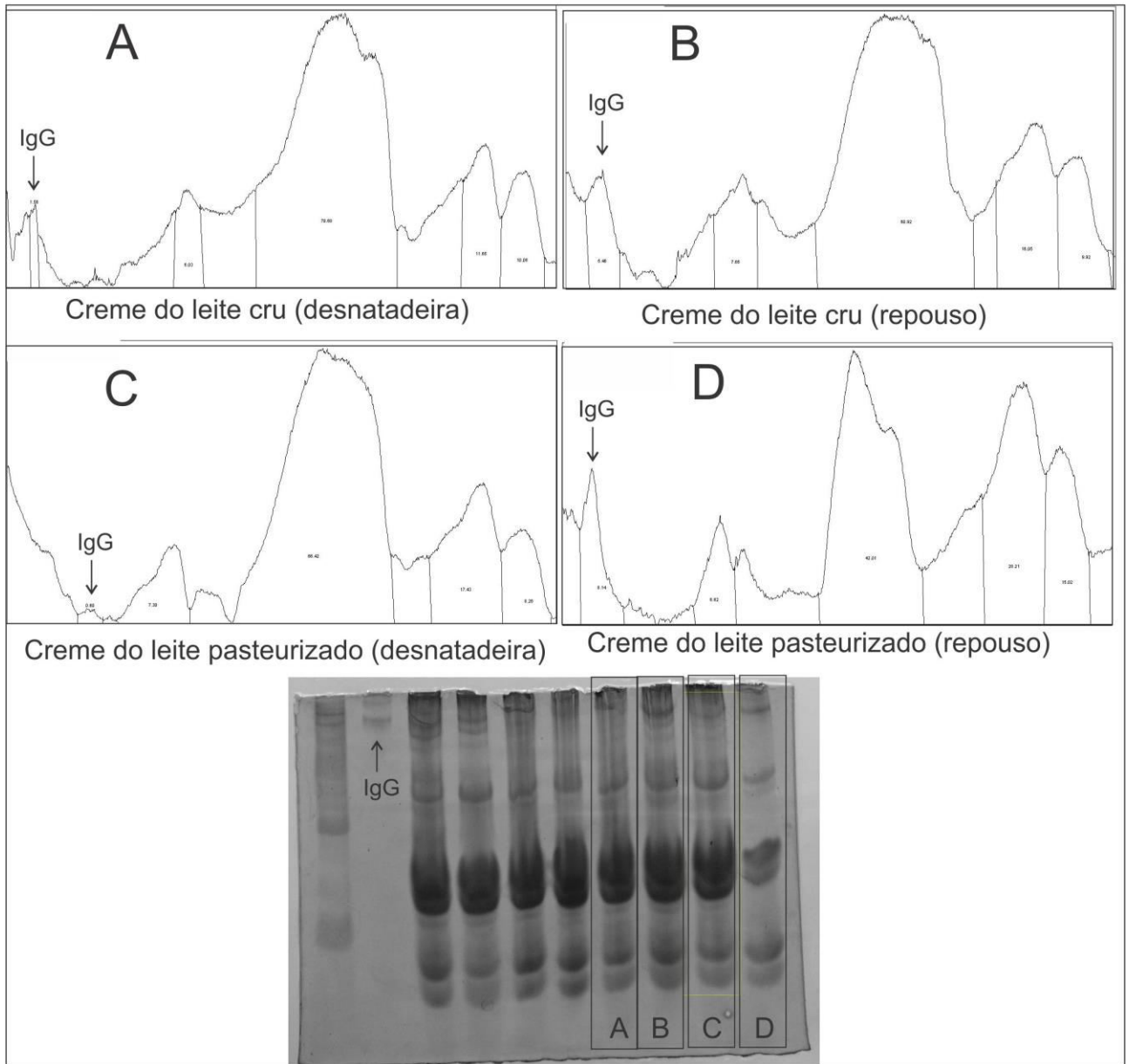


Figura 5. Gráficos gerados pelo programa *Image J* e gel de eletroforese SDS – PAGE a 8% com mudança na coloração para leitura no software para manteiga

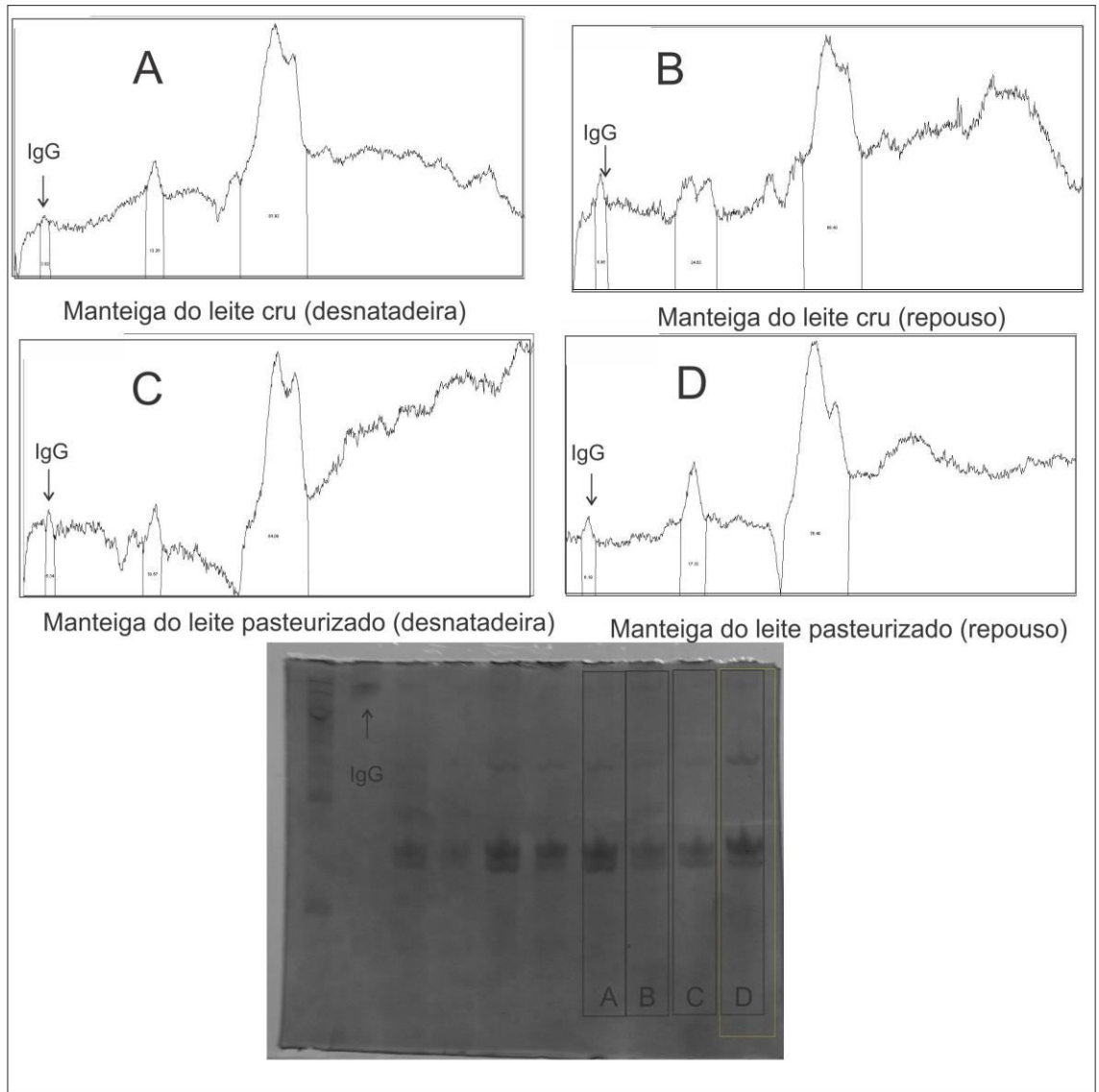
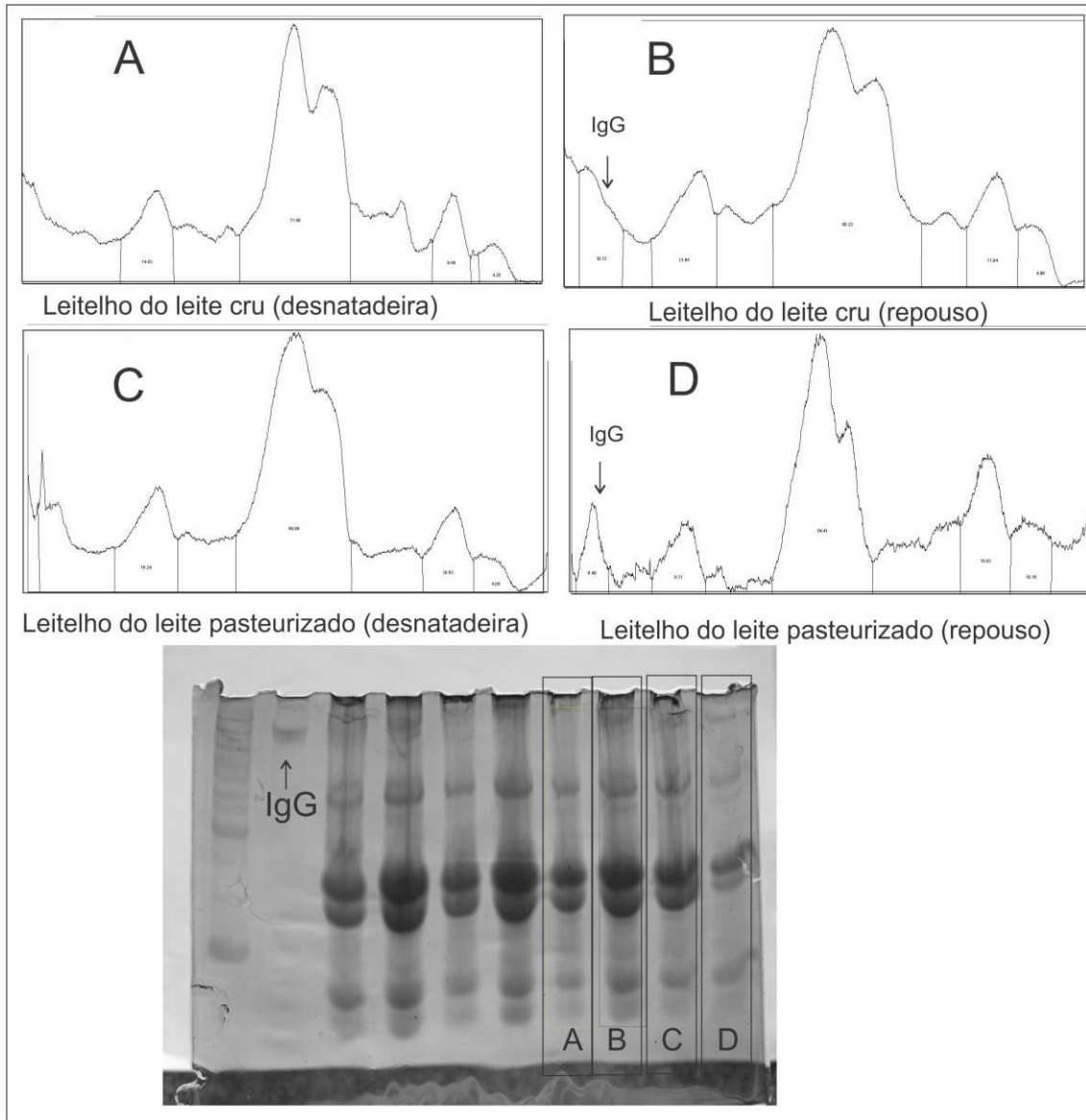


Figura 6. Gráficos gerados pelo programa *Image J* e gel de eletroforese SDS – PAGE a 8% com mudança na coloração para leitura no software para leiteiro



Em estudo realizado por Marques (2011), as bandas correspondentes a α_{s1} e α_{s2} encontram-se agrupadas em uma única faixa densitométrica, correspondente a α -caseína cujo pico é o mais expressivo. Isso também pode ser observado nesse estudo, onde os picos de caseína foram os mais evidenciados e em muito dos gráficos agruparam-se.

Diferente do que propôs Kamoun *et al.* (2003) em que a determinação das frações proteicas por eletroforese foi realizada apenas com leite desnatado, no presente estudo, além do leite desnatado, utilizou-se leite integral, creme de leite, manteiga e leiteiro nas análises, evidenciando não ter ocorrido interferência da gordura no processo.

Segundo Elfstrand (2002), o tratamento pelo calor a 72°C durante 15s resulta numa perda de 10-30% de Ig, enquanto que o tratamento UHT (138°C, 4s) e evaporação destrói a maior parte da atividade de Igs no leite.

O aproveitamento dos componentes do leite bovino, na forma de ingredientes nutritivos e funcionais pode ser utilizado na formulação de produtos com propriedades especiais. Dentre os produtos que poderão ser produzidos a partir do leite estão: manteiga e creme de leite com altos níveis de Imunoglobulinas.

Devido ao fato do método de eletroforese utilizado apresentar resultado apenas semiquantitativo, não foi possível visualizar pequenas diferenças entre os tratamentos que pudessem ser detectadas quantitativamente, de maneira mais detalhada. Desta forma, sugere-se, para estudos futuros, a determinação das imunoglobulinas por cromatografia.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho conclui-se que:

- O método de separação por gravidade foi eficiente para se obter maior concentração de imunoglobulinas na porção gordurosa do leite.
- Através do método de separação de proteínas (Eletroforese) foi possível quantificar as frações de imunoglobulina nos diferentes produtos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLZAN, G. N., ANTUNES, M.M; SCHWEGLE, E. PEREIRA, R.A., CORRÊA, M.N. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. **Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária**. Universidade Federal de Pelotas, janeiro, 2010.

BOUNOUS, G. The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate. **Immunotec Clinical Foundations**, Canadá, 1997, 16p.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2001. 13 p. Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm - Acessado em 21 de janeiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, p. 3977, Seção 1, 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2016. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, Seção 1, n. 08, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite cru refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, Seção 1, n. 251, 30 dez. 2011.

CAKEBREAD, JULIE; HUMPHREY, REX; HODGKINSON, ALISON J. Immunoglobulin A in Bovine Milk: A potencial Functional Food? **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 63, p.7311-7316, 2015.

CAPLAN, Z.; MELILLI, C.; BARBANO, D.M. Gravity separation of fat, somatic cells, and bacteria in raw and pasteurized milks. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.2011-2019, 2013.

ELFSTRAND, L., LINDMARK-MÅNSSON, H., PAULSSON, M., *et al.* Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, v.12, p.879–887, 2002.

EL-ZAHAR, M., EL-LOLY, M. M., S, AZZA S. Gross antibodies, chemical composition of bovine milk and its influence by thermal stability K. **Journal of Agricultural Research, African**, v.10(20), p.2170-2179, May, 2015.

EUBER, J. R.; BRUNNER, J. R. Reexamination of fat globule clustering and creaming in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.2821–2832, 1984.

FONSECA, L. M.; BRADLEY, R. L. Fractionation of whey proteins by complex formation. **US Patent** 6900290 B24, 31 May, 2005.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Ireland, 5 ed, 478p, 1998.

GALLAGHER, S.R. One- dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. **Current Protocols in Immunology**. Chapter 8. Unid. 8.4, 2006.

GEER, S.R.; BARBANO, D.M. Effect of colostrum on gravity separation of milk somatic cells in skim milk. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.687-693, 2014.

HARAGUCHI F.K.; ABREU W.C.; PAULA H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Brasileira de Nutrição**. Campinas, v.19(4), p.479-488, jul./ago., 2006.

HURLEY, W.L., AND P.K. THEIL. Perspective on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**. v. 3, p. 442–474, 2011.

KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrases. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v.90, n.3, p.249-254, 2003.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p.680-685, 1970.

MA, Y; BARBANO, D. M. Gravity separation of raw bovine milk: fat globule size distribution and fat content of milk fractions. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1719-1727, 2000.

MARQUES F.M, SÁ J.F.O, SANTOS M.C, MARTINS M.F, FURTADO M.A.M. Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 70(4), p.473-479, 2011.

MARQUES, M.D.; PEDROSA, C.; PIERUCCI, A.P.T.R; *et al.* Propriedades Biológicas das Proteínas do Soro do Leite Bovino Benéficas à saúde Humana. **Ceres: Nutrição e Saúde**. v.4(2), p. 87-94, 2009.

MCINTOSH, G.H.; REGESTER, G. O; LE LEU, R.K. *et al.* Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**, v.125, p.809-816, 1995.

MCINTOSH, G. H; ROYLE, P. J; LE LEU, R. K. *et al.* Whey protein as functional food ingredients. **International Dairy Journal**, v.8, p.425-434, 1998.

MCINTOSH, G.H.; LE LEU, R.K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. **Nutrition Research**, v. 21, n. 7, p. 1053- 1066, Jul. 2001.

ORDÓÑEZ, A. J. **Tecnologia de alimentos - alimentos de origem animal**. v. 2, 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 49-50.

PACHECO, Maria T. B.; DIAS, Nádia F.G.; BALDINI, Vera L. S. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 2, p. 333-338, abr-jun. 2005.

PARHAM, P. **The Immune System**. Garland Science, New York, 3rd, 2009.

PRATES, J.A.M.; MATEUS, C.M.R.P. Componentes com atividade fisiológica dos alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, p. 3-12, 2002.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela; 517p, 1996.

SGARBIERI, Valdemiro C. Propriedades fisiológico-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4. p. 397-409. Out- Dez, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, jan/mar., 2005.

STOTT, G.H; LUCAS, D.O. Immunologically active whey fraction and recovery process. **US Patent** 4 834 974, 30 May, 1989.

SWAISGOOD, H.E. Characteristics of milk. In: **Food Chemistry** (O. R. Fennema, ed.). Dekker, New York. p. 841. 1996.

TAFFAREL, L.E.; COSTA, P.B.; TSUTSUMI, C. Y. *et al.* Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e resfriamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina/PR, v. 36, n° 3, suplemento 1, p. 2287-2300, 2015.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria. Editora UFSM, 4 ed. 2010.195p.

WILSON, K, WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. New York, 7ed. 2010. 744p.

8. ANEXO 1

Gel para Eletroforese de Proteínas do Leite

PREPARO DO GEL:

1. Monte o suporte do gel de acordo com o protocolo do equipamento.
2. Faça um teste adicionando água na placa de vidro, para verificar se existe algum vazamento.
3. Preparar as soluções dos géis de separação e concentração em tubos tipo Falcon de 15 ml e com auxílio de pipetas descartáveis.

Gel de Separação

	7,5%	8%	10%	12%	12,5%	15%
Sol A	2,5 ml	2,6 ml	3,34 ml	4,0 ml	4,17 ml	5,0 ml
Sol B	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Água dd	4,85 ml	4,65 ml	4,0 ml	3,35 ml	3,16 ml	2,34 ml
Dearear 15 minutos.						
PSA 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

* Quanto maior o PM da proteína menor a concentração do gel.

** Formulação suficiente para 2 géis.

4. Aplicar o gel de separação na placa de vidro e aguardar polimerizar.

Gel de Concentração

	3,0%	4,0%
Sol A	1,0 ml	1,3 ml
Sol C	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml
Água dd	6,4 ml	6,1 ml
Dearear por 15 minutos.		
PSA 10%	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

5. Aplicar o gel de concentração em cima do gel de separação, colocar o pente plástico com cuidado para não haver formação de bolhas;
6. Aguardar a polimerização;
7. Retirar o pente plástico com cuidado e montar a cuba de eletroforese.
8. Acrescentar o tampão de corrida 1X até o volume máximo indicado, incluindo entre as placas de vidro.

9. Aplicar de 5 µl das amostras de proteína nas canaletas e o marcador de peso molecular conforme recomendações do fabricante.
10. Correr a 150 V para melhor separação das bandas.

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Solução A

Acrilamida.....29,2 g

Bis-acrilamida..... 0,8 g

Água miliQ.....70 ml

* Filtrar e armazenar em frasco escuro na geladeira, tempo máximo 1 mês.

Solução B Tris HCl 1,5M, pH 8,8

Tris.....18,15 g

Água miliQ.....80 ml

* Ajustar o pH com HCl puro para 8,8. Armazenar na geladeira a 4°C.

Solução C Tris HCl 0,5M, pH 6,8

Tris.....6,0 g

Água miliQ.....80 ml

* Ajustar o pH com HCl puro para 6,8. Armazenar na geladeira a 4°C.

SDS a 10%

Sodiumduodecylsulfato.....10,0 g

Água miliQ.....100 ml

* Armazenar a temperatura ambiente.

Tampão de amostra 2X

Solução C.....1,2 ml

Glicerol.....1,0 ml

SDS 10%.....2,0 ml

Água miliQ.....4,8 ml

Azul de bromofenol 0,5%..... 0,5 ml

* Armazenar a temperatura ambiente.

Tampão de amostra 2x10 ml
2 - mercaptoetanol.....525 µl

Tampão de Corrida 5X

Tris.....4,5 g
Glicina.....21,6 ml
SDS.....1,5 ml
Água dd.....300 ml
Homogeneizar. Na hora do uso completar com 3 partes de água destilada

* Armazenar na geladeira.

PSA a 10%

Persulfato de amônio.....10 g ou 10 µg
Água dd.....100 ml ou 100 µl

* Armazenar as alíquotas em tubos tipo eppendorf no freezer e descongelar no momento do uso.

Preparo das amostras de proteína

1. Diluir as proteínas 1:3 em tampão de amostra 2X. Levar em Termobloco por 10 minutos a 100°C. Esperar esfriar antes de aplicar na canaleta.

Solução de Fixação

40% de metanol
10% de Acido tricloroacético
50% de água

Solução de Coloração

Comassie Blue R250.....1,25g

Metanol..... 225 ml
Àcido acético glacial.....45 ml
Água dd.....225 ml

Solução descorante

Etanol..... 45 ml
Acido acético glacial.....90 ml
Água dd..... 850 ml