

## Comparação entre métodos clássicos para determinação de proteínas em soro de leite bovino

Julia Kassuga Palma<sup>1</sup> (IC)\*, Ágatha A. de A. Andrade<sup>1</sup> (IC), Eliane T. Marsico<sup>2</sup> (PQ), Felipe S. Semaan<sup>1</sup> (PQ), Flávia F. de C. Marques<sup>1</sup> (PQ), Annibal D. Pereira Netto<sup>1</sup> (PQ). \*[julia.kassuga@gmail.com](mailto:julia.kassuga@gmail.com)

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Outeiro São João Batista s/n, Niterói – RJ, CEP 24020-141; <sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense

Palavras Chave: proteínas, albumina, soro de leite bovino

### Introdução

O leite é um alimento de elevado valor biológico, podendo ser fonte de boa parte das necessidades diárias de proteínas, que têm papel fundamental no organismo humano. Para a determinação de proteínas em soro de leite, quatro métodos espectrofotométricos clássicos ((**Biu**) Biureto<sup>1</sup>, (**Bra**) Bradford<sup>2</sup>, (**Lo**) Lowry<sup>3</sup> e (**LM**) Lowry modificado<sup>3</sup>) foram avaliados e comparados com relação à sensibilidade e algumas fontes de incerteza, como repetitividade ( $u_r$ ), reprodutibilidade ( $u_R$ ) e incerteza da curva ( $u_{curva}$ ). Para tal, utilizou-se a albumina bovina como padrão e o soro do leite integral (UHT) bovino como matriz de análise.

### Resultados e Discussão

As medidas foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Evolution 600, seguindo condições de cada método. A Tabela 1 resume os diferentes reagentes utilizados.

**Tabela 1.** Métodos e reagentes empregados

<b>Biu</b>	(Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,05 M, CuSO <sub>4</sub> 0,052 M e Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,57 M) + NaOH 50%
<b>Bra</b>	Coomassie Brilliant Blue + etanol 95% e H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Lo</b>	<b>A</b> (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e NaOH 1,0 M) + <b>B</b> (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, NaOH 1,0 M) + <b>C</b> (Folin-Ciocalteu e H <sub>2</sub> O 1:15 v/v)
<b>LM</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O + KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O acrescido de SDS, NaOH 1 M e Folin-Ciocalteu.

Curvas analíticas foram obtidas a partir do padrão de albumina bovina, sendo, então, calculadas as figuras de mérito e incertezas de cada método (Tabela 2). Amostras de soro do leite foram preparadas a partir de 200 mL de leite bovino integral (UHT) aquecido a 45°C, aos quais foram adicionados 10,0 mL de ácido acético P.A., para precipitação total da caseína. Após filtração da caseína em papel de filtro Qualy (12,5 φ), o soro foi centrifugado a 6000 rpm por 30 min e utilizado para determinações de proteína (Tabela 3). Análise de Variância indicou que havia diferença entre os valores obtidos pelos diferentes métodos, o que certamente é devido aos resultados do método de Bradford. As médias de cada método foram sempre inferiores ao obtido pelo método de Kjeldahl, considerado como referência (Tabela 3). Teste-t ( $p=0,05$ ;  $n = 6$ ) indicou que estes valores eram

sempre significativamente diferentes que os obtidos pelo método de Kjeldahl.

**Tabela 2.** Figuras de mérito dos métodos estudados

	<b>Biu</b>	<b>Bra</b>	<b>Lo</b>	<b>LM</b>
<b>λ (nm)</b>	550	595	650	750
<b>a</b> (coef. angular)	0,0003	0,0319	0,0177	0,0034
<b>b</b> (coef. linear)	0,0012	0,0518	0,0753	0,0505
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9984	0,9863	0,9901	0,9951
<b>LD<sup>x</sup></b>	$1,08 \times 10^{-3}$	$3,35 \times 10^{-4}$	$3,72 \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-3}$
<b>LQ<sup>y</sup></b>	$3,58 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-3}$	$1,24 \times 10^{-3}$	$3,89 \times 10^{-3}$
<b>u<sub>curva</sub></b>	$3,26 \times 10^{-3}$	$2,97 \times 10^{-5}$	$4,11 \times 10^{-5}$	$1,79 \times 10^{-4}$
<b>u<sub>r</sub></b>	0,39%	0,45%	0,47%	0,36%
<b>u<sub>R</sub></b>	1,94%	0,75%	7,36%	23,16%

$x = 3.S_{branco}/m$ ;  $y = 10.S_{branco}/m$ , onde  $S_{branco}$  é o desvio padrão de dez medidas do branco e  $m$  é a inclinação da curva. Valores em %m/v.

**Tabela 3.** Percentagens (m/v) de proteína no soro de leite bovino obtidas pelos diferentes métodos

	<b>Proteínas, % (m/v).</b>	<b>Erro %, (referência = 0,71%)</b>
<b>Biu</b>	0,54 ± 0,14	25 ± 0,20
<b>Bra</b>	0,22 ± 0,01	69 ± 0,02
<b>Lo</b>	0,56 ± 0,04	21 ± 0,07
<b>LM</b>	0,61 ± 0,13	15 ± 0,18

\*Média dos resultados obtidos pelo método de Kjeldahl.

### Conclusões

Os métodos estudados, apesar do baixo custo e da simplicidade, apresentaram diferentes sensibilidades. No entanto, a precisão, avaliada por sua repetitividade, não variou significativamente. Com exceção do método de Bradford, apesar dos resultados obtidos com os outros métodos terem sido similares ao reportado no rótulo da embalagem (3,0% de proteína total, sendo 0,6% de albumina no soro<sup>4</sup>), eles apresentaram diferenças significativas quando comparados com o método de referência (Kjeldahl), como comprovado pelo teste t. Os resultados obtidos sugerem que os métodos estudados podem levar a estimativas distintas para as concentrações de proteínas em uma mesma amostra de soro de leite.

### Agradecimentos

PIBIC-UFF-CNPq; CNPq; FAPERJ

<sup>1</sup> Curtis, M. D.; Shiu, K.; Butler, W. M. e Huffmann, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3335.

<sup>2</sup> Bradford, M. *Analytical Biochemistry*, **1976**, *72* 248-254.

<sup>3</sup><http://www.rur.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/lowry.html>, acessado em 26/07/2010

<sup>4</sup> Filho, J. R. F *et al. Rev. Bras. de Tec. Agroind.*, **2009**, *3* (1), 42-48.