

Perfil eletroforético qualitativo das proteínas do leite de vacas submetidas a manejo aversivo

Mônica Daiana de Paula Peters¹
Isabella Dias Barbosa Silveira²
Camila Pegoraro³
Carlos Eduardo da Silva Pedroso²
Lívia Argoud Lourenço⁴
Marcos Casagrande⁵

Resumo: Existem poucos trabalhos que avaliem a influência do manejo na qualidade do leite e, ainda, com resultados pouco conclusivos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do manejo aversivo no perfil eletroforético qualitativo das caseínas do leite. Foi determinado o perfil eletroforético das caseínas do leite de vacas, da raça Holandês, submetidas aos tratamentos de manejo aversivo e manejo não aversivo, por um período de 24 dias. Ao final deste período de manejo, foram coletadas quatro amostras de leite de cada tratamento, com posterior centrifugação e liofilização. A técnica de dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida (SDS-PAGE) foi utilizada para migração eletroforética e, devido ao melhor resultado na visualização do gel apresentado por amostras submetidas ao processo de diálise, adotou-se este como procedimento padrão nas análises. Concluiu-se que o leite de vacas submetidas ao manejo aversivo não apresenta alteração do perfil eletroforético qualitativo das caseínas.

Palavras-chave: Bovinos leiteiros. Manejo. Caseína. Eletroforese.

Abstract: There are few studies that evaluate the influence of management on milk quality, and yet, with inconclusive results. This work aimed at evaluating the effect of management aversive quality in the electrophoretic profile of the casein of milk. It was determined the electrophoretic profile of caseins from milk of Holstein cows, submitted to aversive management treatments and non-aversive management, during 24 days. At the end of this period of treatments 4 milk samples were collected from cows of each treatment, centrifugated and lyophilised. The SDS-PAGE technique was used for eletrophoretic migration and due to the best result in the gel visualization presented by the submitted samples to the process of dialysis and it was adapted as standard procedure for continuing analyses. It is concluded that cows submitted to aversive management do not produce milk with alteration in the eletrophoretic profile of caseins.

Keywords: Dairy cattle. Management. Casein. Electrophoresis.

1 Doutora em Ciências/Produção Animal/UFPel; Engenheira Agrônoma do Instituto Federal Sul-rio-grandense/Campus Bagé.

2 Doutor (a) em Ciências/UFPel; Professor adjunto, Universidade Federal de Pelotas.

3 Pós-graduanda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

4 Graduanda em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

5 Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

1. Introdução

As proteínas do leite contêm todos os aminoácidos essenciais ou indispensáveis nas proporções requeridas para crescimento e manutenção do organismo humano (PINHEIRO & MOSQUIM, 1991). Do ponto de vista nutritivo e industrial, as proteínas do leite de mais ampla aplicação e valor econômico são as caseínas e as proteínas do soro. No leite de vaca a relação entre caseína e proteína do soro é de aproximadamente 80% para caseína e 20% para as proteínas do soro (SGARBIERI, 2005).

A importância nutricional, funcional e a grande diversidade das proteínas presentes no leite explicam o interesse no estudo da composição desta fração. Adicionalmente, os consumidores exigem cada vez mais que os alimentos tenham qualidade, inclusive os produtos lácteos, pois buscam produtos seguros, nutritivos e que tenham sabor fresco (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

A composição proteica do leite pode ser determinada por diferentes técnicas, dentre elas a eletroforese, a qual é uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo. Esta técnica 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).

Além disso, as práticas de manejo adotadas nos diferentes sistemas de criação podem resultar em consequências para a qualidade do leite. Em alguns sistemas encontram-se tratadores com pouco tempo para interagir com os animais, por vezes pouco qualificados para exercer com êxito a função. Esses problemas ocasionam o manejo inadequado dos animais que consiste na utilização de gritos, chutes, ferrões, entre outras práticas de manejo aversivas. Os poucos trabalhos existentes com relação à influência do manejo na qualidade do leite ainda são contraditórios. Segundo Hemsworth *et al.* (2000) o manejo negativo/aversivo foi correlacionado significativamente e negativamente com os teores de proteína. Entretanto, resultados obtidos por Peters *et al.* (2010) não confirmam tal conclusão, uma vez que o manejo negativo/aversivo não foi correlacionado significativamente com os componentes do leite. Contudo, estes trabalhos relatam apenas o efeito do manejo aversivo na quantidade de proteína total. No entanto, nenhum trabalho relata o efeito sobre as frações de proteínas, como as caseínas do leite.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do manejo aversivo no perfil eletroforético qualitativo das caseínas do leite.

2. Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido em Unidade de Produção Leiteira (UPL), situada no município de Pelotas, região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de maio a junho de 2007, totalizando 24 dias.

Foram utilizadas 32 vacas da raça Holandês, divididas em dois grupos e submetidas aos seguintes tratamentos: manejo aversivo e manejo não aversivo, segundo um delineamento completamente casualizado.

Cada vaca foi considerada uma unidade experimental, o que resultou em 16 repetições por tratamento.

O tratamento aversivo consistiu em bater com “vara”, conduzir com gritos, e não respeitar a velocidade de deslocamento dos animais (Adaptado de HÖTZEL *et al.*, 2005). O tratamento não aversivo consistiu em não promover estimulação ativa às vacas, ou seja, não era empregada nenhuma ação positiva ou negativa na condução dos animais. Os tratamentos foram aplicados na condução dos animais da sala de espera para a sala da ordenha.

As demais práticas de manejo foram iguais para os animais de ambos os tratamentos, sendo as ordenhas realizadas duas vezes ao dia, manhã (entre as 6h e às 8h) e tarde (entre as 15h e às 17h). O manejo de ordenha caracterizou-se pela tranquilidade na execução das atividades de rotina, sem utilização de gritos, tapas ou qualquer outro tipo de ação que influenciasse o animal.

Ao final do período de aplicação dos tratamentos (manejos) foram coletadas, aleatoriamente, oito amostras de leite, quatro de vacas submetidas ao manejo aversivo e outras quatro de vacas submetidas ao manejo não aversivo. Após coletadas, as amostras foram imediatamente identificadas, acondicionadas em caixa térmica a -5°C e conduzidas ao laboratório. O leite foi desnatado por centrifugação (2100 rpm por 30 min. a 32°C) e, posteriormente desidratado com a utilização de liofilizador. Em seguida, as amostras foram armazenadas a vácuo em temperatura de 4°C por 60 dias.

Para determinação das proteínas do leite utilizou-se a técnica de SDS-PAGE para a migração eletroforética, adaptado de Egito *et al.*, 2006. Utilizou-se 0,02g de cada amostra de leite diluída em 1500 μL de H_2O , ajustando-se o pH para 4,2 através da adição de HCl 1M, submetendo-as em seguida a centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente. Ao precipitado, foram adicionados 1000 μL de água destilada e homogeneizados com auxílio de vórtex durante 5 min, seguida de nova centrifugação a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, o *pellet* foi eluído com 1000 μL de Tris-HCl pH 6,8 com 5% de β -mercaptoetanol e 0,1% SDS e aquecido a 100°C por 3 minutos.

Em seguida três amostras, escolhidas aleatoriamente, foram submetidas a diálise com utilização de membranas (com tamanho de 33 mm x 21 mm, porosidade de 13 KDa) emergidas em tampão TTBS 1X (Tris 20mM, NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6) durante 24 horas, enquanto as demais amostras não passaram por este processo. Para continuidade das análises, adotou-se submeter todas as amostras a diálise, pois com este procedimento apresentaram melhor visualização das frações de proteínas.

Após, adicionou-se tampão de carga 2X (Tris/HCl pH 6,8 100mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e Glicerol 20%) a todas as amostras e aplicaram-se *Stacking Gels* 5% e gel de acrilamida 15% (m/v), conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). A migração proteica foi realizada em cubas de eletroforese *Bio-Rad*[®] a 150V, em tampão (Tris-base 25mM, glicina 50mM e SDS 0,1%), durante 90 min. O gel foi corado com *Coomassie blue* (0,05% Coomassie blue; 10% ácido acético glacial; 50% metanol; 40% H_2O Milli-Q) durante 30 min sobre agitação e, logo em seguida, descorado com tampão descorante (10% ácido acético glacial; 50% metanol; 40% H_2O Milli-Q). Posteriormente, visualizou-se o gel em transiluminador UV e fotografou-se com *kodak digital science*[™] DC40câmera.

3. Resultados e Discussão

Observa-se, na figura 1, que não há diferença entre o perfil das caseínas do leite de vacas submetidas ao manejo aversivo e ao não aversivo. Assim, na imagem verificam-se com igual nitidez e definição as três caseínas (α S 1, β e κ) para ambos os tratamentos. Provavelmente, isto ocorreu devido a curta duração do tratamento, em que o estímulo estressor não foi suficiente para causar alterações na fração proteica do leite.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Peters *et al.* (2010), no qual não verificou-se diferença quantitativa no percentual de proteínas totais do leite de vacas submetidas aos manejos aversivo e não aversivo. Portanto, tanto a avaliação qualitativa feita no presente trabalho como a quantitativa feita no trabalho supracitado não diferem entre manejos aversivo e não aversivo.

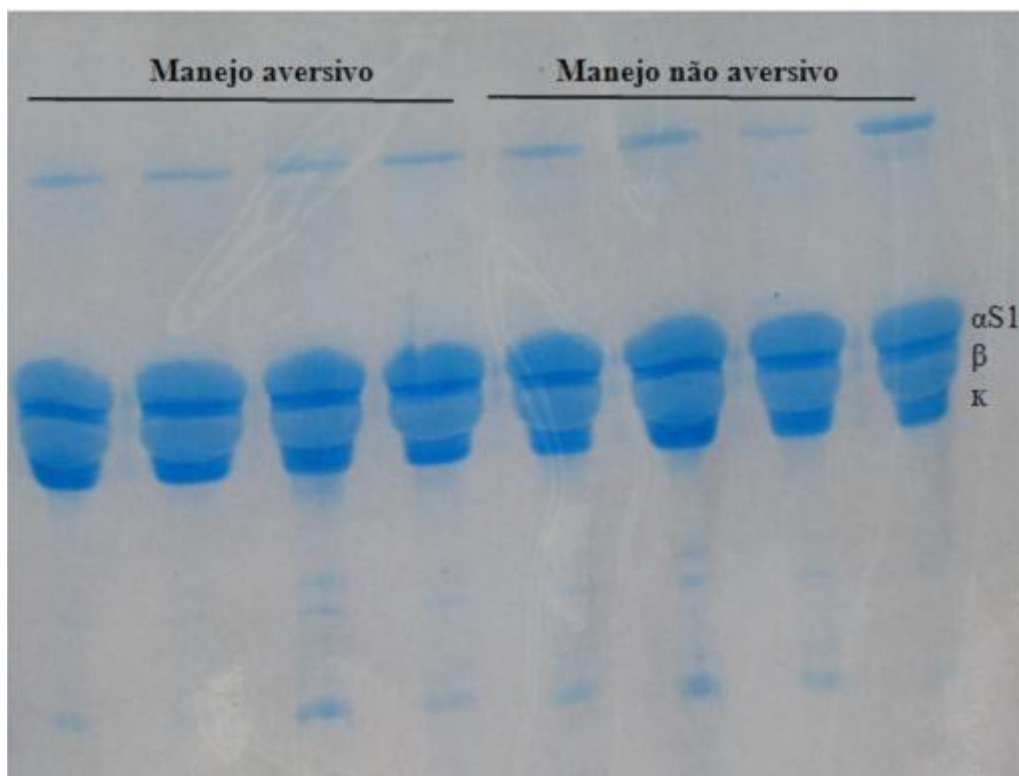


Figura 1 - Perfil eletroforético das caseínas do leite de vacas submetidas ao manejo aversivo e ao não aversivo.

Além disso, devido ao fato de o método eletroforético utilizado apresentar resultado apenas qualitativo, 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 quantificação aproximada em cima do perfil eletroforético das caseínas utilizando um densitômetro, no comprimento de onda correspondente à absorção do corante (JAMES, 1995) ou à determinação das caseínas por cromatografia (FERREIRA *et al.*, 2000).

4. Conclusão

O leite de vacas submetidas ao manejo aversivo, nas condições do estudo, não apresenta alteração qualitativa do perfil eletroforético das caseínas.

Referências bibliográficas

- BRAMMER, S.P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 13 p. 2001. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm>. Acessado em: 5 out. 2009.
- EGITO, A.S.; ROSINHA, G.M.S.; LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDET, J.M.; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.932-939, 2006.
- FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; MENDES, E.; MARQUES, J.; FERREIRA, M.A. Development, validation, and application of na HPLC/UV method for quantification of casein in infant formulae and follow-up milks. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**; 23, 13, pp. 2057-2065, 2000.
- HEMSWORTH, P.H.; COLEMAN, G.J.; BARNETT, J.L.; BORG, S. Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows. **Journal Animal Science**, v.78, p. 2821-2831, 2000.
- HÖTZEL, M. J.; PINHEIRO MACHADO FILHO, L. C. ; YUNES, M. C.; SILVEIRA, M.C.A.C. Influência de um Ordenhador Aversivo sobre a Produção Leiteira de Vacas da Raça Holandesa. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n.4, p.1278-1284, 2005.
- JAMES, C.S. “Principles of techniques used in food analysis”, Analytical chemistry of foods. **Blackie Academic & Professional**, UK, capítulo 3, p. 18-35, 1995.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Ed. Milkbuzz, 188p, 2002.
- PETERS, M.D.P.; BARBOSA SILVEIRA, I.D.; PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C.; MACHADO, A.A.; PEREIRA, L.M.R. Manejo aversivo em bovinos leiteiros e efeitos no bem-estar, comportamento e aspectos produtivos. **Revista Archivos de Zootecnia**, v.59, p. 435-442, 2010.
- PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. Apostila: **Processamento de leite de consumo**. Dep. Tecnologia de Alimentos. UFV: Viçosa, 183p, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v. 1-3, 236 p, 1989.
- 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.