

# EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO LEITE BUBALINO USANDO A COMBINAÇÃO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC) E MEDIDAS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)



## **Julián Andrés Castillo Vargas**

*Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Medellín, Colômbia  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil  
Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína, Tocantins, Brasil*

## **Vinícius da Silva Botelho Duarte Gomes**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil  
Premix Nutrição Animal, Belém, Pará, Brasil*

## **Tiago Costa de Araújo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## **Rafael Mezzomo**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## **Raylon Pereira Maciel**

*Universidade Federal Rural da Amazônia, Parauapebas, Pará, Brasil*

## 1. Resumo

O desenvolvimento de novos métodos para estimar o número de variantes proteicas de caseína (CN) e proteínas no soro do leite de búfala é necessário para otimizar as propriedades tecnológicas e nutricionais dos derivados lácteos desta espécie. Desta forma, no presente capítulo, propõe-se um método para quantificar as principais variantes proteicas da caseína e as principais proteínas no soro do leite de búfalas, utilizando a combinação de medidas derivadas das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e medidas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). O método envolve uma extração líquido-líquido sequencial das frações proteicas usando solução tampão de BisTris, cloridrato de guanidina, citrato de sódio e dl-ditiotreitol. O extrato final obtido deve ser analisado por RP-HPLC-DAD, usando-se o valor de caseína e proteína totais obtido por NIRS para a quantificação das proteínas separadas e identificadas.

## 2. Introdução

As variantes proteicas de caseínas (CN) e proteínas do soro no leite de ruminantes são conhecidas por sua influência diferencial nas propriedades tecnológicas e nutricionais dos produtos derivados do leite (Fox e McSweeney, 2003). Portanto, é necessário identificá-las e quantificá-las de forma eficiente no leite de diferentes espécies de ruminantes. Entre os ruminantes, o búfalo tem sido objeto de especial atenção mundial recentemente, devido à sua capacidade de adaptação a diferentes condições geográficas, bem como pela ampla variedade de produtos lácteos que podem ser fabricados a partir de seu leite (Oliveira et al., 2020; Lima et al., 2021). Além disso, o leite de búfala tem

apresentado efeitos benéficos para à saúde humana, comparado ao leite bovino devido à sua composição química (Patiño et al., 2012), o que tem aumentado as demandas deste produto para consumo humano.

Portanto, é necessário identificá-las e quantificá-las de forma eficiente no leite de diferentes espécies de ruminantes. Entre os ruminantes, o búfalo tem sido objeto de especial atenção mundial...

Os fatos anteriormente mencionados têm estimulado o desenvolvimento de métodos precisos para a determinação e caracterização da proteína do leite de búfala, nos quais, atualmente, a Cromatografia Líquida em Fase Reversa acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS; Feligini et al., 2009) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (RP-HPLC-DAD; Bonfatti et al., 2013) têm mostrado resultados satisfatórios. No

entanto, o detector de espectrometria de massa não está disponível na maioria dos laboratórios analíticos devido aos seus altos custos. Além disso, a quantificação de proteínas usando apenas RP-HPLC-DAD requer padrões puros, que no caso do leite de búfala não estão disponíveis comercialmente (Bonfatti et al., 2013). Assim, para a quantificação usando curvas de calibração, esses padrões precisam ser isolados e purificados do leite de búfala por cromatografia líquida preparativa (Bonfatti et al., 2013), um método complexo que requer etapas especializadas e equipamentos não comumente disponíveis em laboratórios analíticos não especializados em extração e caracterização de metabolitos. Isto sugere, que métodos mais aplicáveis a condições reais precisam ser propostos.

Uma estratégia para superar a dificuldade acima mencionada, poderia estar focada na combinação das técnicas cromatográficas, com diversos métodos espectroscópicos de análise, dada sua seletividade e acurácia. Um destes métodos, pode ser a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), a qual tem sido usada amplamente para determinar a composição do leite de ruminantes (Melfsen et al. al., 2020). Em um relatório típico de análise química do leite por NIRS, os teores de proteína total e caseína podem ser determinados com precisão (Tsenkova et al., 2000). Assim, esta técnica pode ser facilmente associada a outras técnicas analíticas para melhorar o entendimento da composição proteica do leite de ruminantes.

A proteína total do leite de búfala consiste em cerca de 20% de proteínas do soro do leite, com os principais componentes  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) e 80% de caseínas, divididas nas principais subclasses  $\alpha$ -( $\alpha$ S1- e  $\alpha$ S2-),  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína (-CN), que estão dispostas em micelas (Swaisgood, 1982). Considerando que a RP-HPLC-DAD fornece estimativas precisas das proporções de variantes de caseína e proteínas do soro do leite, assim como a NIRS fornece um valor preciso dos teores de proteína total e caseína, a combinação de ambas as técnicas poderia facilitar a análise quantitativa das frações proteicas do leite de búfala, superando as limitações técnicas acima mencionadas quanto ao uso exclusivo de RP-HPLC-DAD ou LC-MS. Assim, o presente capítulo apresenta um método para quantificar diferentes variantes proteicas de caseína e principais proteínas do soro do leite de búfalas, utilizando a combinação das técnicas de RP-HPLC-DAD e NIRS.

## 3. Reagentes

### 3.1. Soluções para extração de proteínas

3.1.1. *Solução A:* Esta solução (pH = 7,0) contém tampão BisTris (lote B-9754, pureza > 98%, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,1 M, cloridrato de

guanidina (lote G-4505. Pureza > 99%, Sigma Aldrich®) na concentração de 6 M, citrato de sódio (Sigma Aldrich®) na concentração de 5,37 mM e dl-ditiotreitol (lote 43817, pureza > 98%, Sigma Aldrich®) na concentração de 19,5 mM.

Nota: Prepare esta solução diariamente.

3.1.2. *Solução B*: esta solução contém cloridrato de guanidina (lote G-4505. Pureza > 99%, Sigma Aldrich®) na concentração de 4,5 M. O solvente desta solução é uma mistura composta de acetonitrila (grau HPLC): água Milli-Q®: ácido trifluoroacético (TFA, Sigma Aldrich®) na proporção 100:900:1 (v:v:v).

Notas:

- a. Manuseie o TFA com extremo cuidado.
- b. Use uma cabine de extração para preparar esta solução.

### 3.2. Fases móveis para HPLC

3.2.1. *Fase móvel A*: preparar uma solução de TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®.

3.2.2. *Fase móvel B*: preparar uma solução de TFA a 0,1% v/v em acetonitrila (grau HPLC).

## 4. Equipamento

### 4.1. Equipamento de laboratório

- a. HPLC equipado com coluna de guarda C8, coluna C8, forno, amostrador automático com refrigerador de líquidos (mínimo: 4 °C) e detector de arranjo de diodos (DAD).
- b. Centrífuga (atingindo pelo menos 14,000 x g).
- c. Freezer (temperatura mínima de -20 °C).
- d. Vórtex.
- e. Balança analítica.

### 4.2. Materiais

- a. Tubos Safe-Lock Eppendorf® de 2,2 mL (dois por amostra).
- b. Suporte para tubos Eppendorf®.

- c. Balões volumétricos.
- d. Micropipetas automáticas e ponteiras.
- e. Vials, tampas e septos para cromatografia (um conjunto por amostra).
- f. Microespátula.

## 5. Procedimento

### 5.1. Extração de variantes proteicas

- 5.1.1. No dia da análise, se as amostras estiverem congeladas, descongelá-las a temperatura ambiente (25 °C).
- 5.1.2. Pegar uma alíquota de 1 mL de leite e transferi-la para uma bala Eppendorf® de 2,2 mL usando pipeta automática.
- 5.1.3. Adicionar 1 mL de solução A à bala Eppendorf® de 2,2 mL contendo a amostra de leite (1:1 - amostra: solução A).
- 5.1.4. Agitar a mistura em um vórtex por 10 s em velocidade média.
- 5.1.5. Incubar a mistura à temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h.

#### Nota:

A sala na qual a incubação está sendo executada pode ser climatizada (25 °C) usando uma unidade de ar-condicionado. A padronização das condições de incubação contribui à diminuição das variações ao longo dos diferentes dias de processamento.

5.1.6. Centrifugar a 14,000 x g por 5 min.

5.1.7. Uma camada de gordura superior é formada após a centrifugação. Em seguida, removê-la cuidadosamente usando uma microespátula.

5.1.8. Pegar 450 µL do sobrenadante e transferi-lo para uma nova bala Eppendorf® de 2,2 mL. A esta mesma bala, adicionar 1350 µL de solução B (1:3 - sobrenadante: solução B).

5.1.9. Transferir 1 mL da mistura para um vial cromatográfico para análise por HPLC.



5.1.10. Analisar as amostras por RP-HPLC-DAD. Nota: armazenar as amostras sob refrigeração a 4 °C até a análise.

## 5.2. Análise cromatográfica (condições)

- Temperatura da coluna: 45 °C.
- Volume de injeção: 5 µL.
- Fase estacionária: coluna Hypersil GOLD™ C8 (3 µm, 150 x 4,6 mm) equipada com coluna de guarda Hypersil GOLD™ C8 (5 µm, 10 mm).
- Comprimento de onda de trabalho: 214 nm.
- Modo: gradiente, fluxo constante: 0,500 mL/min (ver gradiente de eluição na tabela 1).

Tabela 1. Gradiente de eluição a ser usado na corrida cromatográfica. Fonte: Autores.

Nível	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Curvatura
1	-13,000		Equilíbrio		
2	-13,000	0,500	67	33	5
3	-12,001	0,500	67	33	5
4	-12,000	0,750	67	33	5
5	-11,001	0,750	67	33	5
6	-11,000	1,000	67	33	5
7	-10,001	1,000	67	33	5
8	-10,000	1,250	67	33	5
9	-9,001	1,250	67	33	5
10	-9,000	1,500	67	33	5
11	-8,001	1,500	67	33	5
12	-8,000	1,750	67	33	5
13	-7,001	1,750	67	33	5
14	-7,000	2,000	67	33	5
15	-3,001	2,000	67	33	5
16	-3,000	1,500	67	33	5
17	-2,001	1,500	67	33	5
18	-2,000	1,000	67	33	5
19	-1,001	1,000	67	33	5
20	-1,000	0,500	67	33	5
21	0,000	0,500	67	33	5

Nível	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Curvatura
22	0,000		Corrida cromatográfica		
23	0,000	0,500	67	33	5
24	5,000	0,500	65	35	5
25	5,001	0,500	65	35	5
26	9,000	0,500	63	37	5
27	9,001	0,500	63	37	5
28	18,000	0,500	60	40	5
29	18,001	0,500	60	40	5
30	22,000	0,500	59	41	5
31	22,001	0,500	59	41	5
32	27,500	0,500	59	41	5
33	27,501	0,500	59	41	5
34	28,000	0,500	57	43	5
35	28,001	0,500	57	43	5
36	36,000	0,500	55	45	5
37	36,001	0,500	55	45	5
38	40,000	0,500	55	45	5
39	40,000		Fim da corrida cromatográfica		

Notas:

- a. A = 0,1% TFA em água; B = 0,1% TFA em acetonitrila;
- b. Os tempos negativos correspondem a um processo de equilíbrio de fase estacionária, que deve ser feito antes da injeção de cada amostra. Durante este tempo, a amostra não é injetada no equipamento, porém, a amostra já deve estar no rack do cromatógrafo.

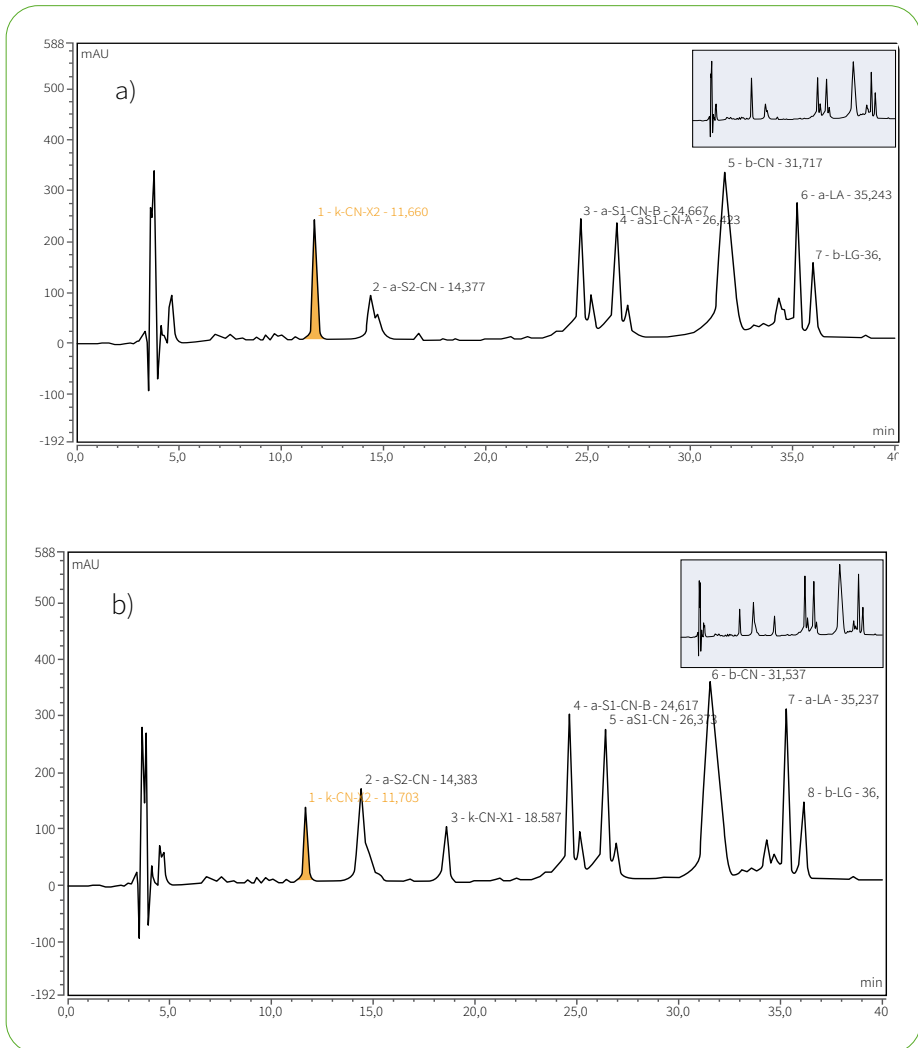
### 5.3 Análise NIRS

Determinar os teores de proteína total e caseína em g/100 g de leite, bem como sua densidade usando um equipamento NIRS (existem diversas marcas comerciais, para as quais diversos protocolos de análise são definidos). As descrições destes protocolos, escapam dos objetivos deste capítulo. Para mais detalhes do uso do NIRS em ciências da produção animal, consulte a Evangelista et al. (2022); Giannuzzi et al. (2022) e Yakubu et al. (2022).

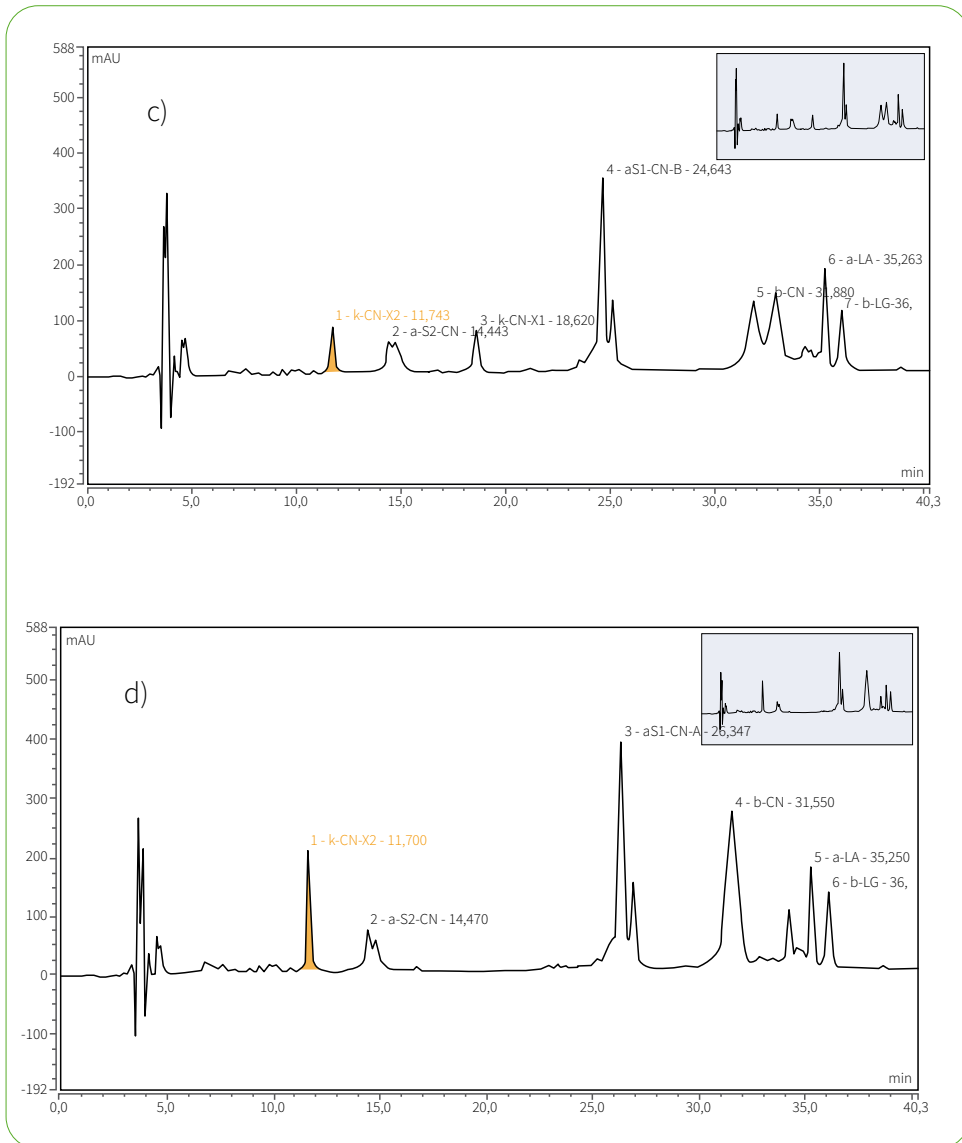
## 6. Cálculos

**6.1. Determinar a área de pico para cada proteína no cromatograma, incluindo variantes de caseínas ( $\kappa$ -CN X2,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN X1,  $\alpha_{s1}$ -CN B,  $\alpha_{s1}$ -CN A e  $\beta\gamma$ -CN) e proteínas no soro do leite ( $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) (Figura 1). Leve em consideração que algumas variantes de caseína podem estar ausentes na amostra.**

**Figura 1.** Perfis cromatográficos do leite bubalino de diferentes búfalas (a, b, c e d). Considere que nem todas as variantes de caseína são expressas ao longo do leite de diferentes animais. Fonte: Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) Software







**6.2. Para o cálculo das quantidades de variantes de caseína ( $\kappa$ -CN X2,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN X1,  $\alpha_{s1}$ -CN B,  $\alpha_{s1}$ -CN A e  $\beta\gamma$ -CN), usar o seguinte procedimento:**

6.2.1. Calcular a área total dos picos das variantes de caseína (soma das áreas dos picos).

6.2.2. Calcular a proporção de cada variante de caseína de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Proporção de variante de caseína} = \frac{\text{área de pico de variante de caseína}}{\text{soma de áreas de pico de variantes de caseína}}$$

6.2.3. Calcular a concentração de cada variante de caseína em g/100 g de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração da variante de caseína (g/100g de leite)} = \text{Teor de caseína (g/100 g de leite)} \times \text{Proporção da variante de caseína}$$

6.2.4. Facultativo: pode calcular a concentração da variante caseína em g/L de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração da variante de caseína (g/L leite)} = (\text{Concentração da variante de caseína (g/100 g de leite)}) \times (\text{densidade do leite (g/mL)}) \times 10$$

### **6.3. Para o cálculo das quantidades de variantes de proteínas do soro de leite ( $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg), usar o seguinte procedimento:**

6.3.1. Calcular a área total de variantes de proteínas do soro de leite (soma das áreas de pico).

6.3.2. Calcular a proporção de cada variante de proteína do soro de leite de acordo com a seguinte equação:

$$\begin{aligned} \text{Proporção de variante de proteína do soro de leite} \\ = \frac{\text{área de pico de variante de proteína do soro de leite}}{\text{soma das áreas de pico de proteína do soro de leite}} \end{aligned}$$

6.3.3. Calcular a proteína total do soro de leite assumindo que a proteína total do leite = caseína + proteína do soro de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Teor de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)} = \text{proteína total do leite (g/100 g de leite)} - \text{caseína (g/100 g de leite)}$$

6.3.4. Calcular a concentração de cada variante de proteína do soro de leite em g/100 g de leite, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Concentração de variante de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)} = \text{Teor de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)} \times \text{Proporção de variante de proteína do soro de leite}$$

6.3.5. Opcional: pode calcular a concentração de variantes de proteína do soro de leite em g/L de leite, usando a seguinte equação:

$$\text{Concentração de variante de proteína do soro de leite (g/L leite)} = (\text{Concentração de variante de proteína do soro de leite (g/100 g de leite)}) \times (\text{densidade do leite (g/mL)}) \times 10$$

## 7. Tempo de análise

- Preparação de soluções e materiais: 30 min
- Exatracão de variantes de proteínas: um lote de 24 amostras: 101 min.
- Tempo total da análise cromatográfica (por amostra): 53 min (13 min de equilíbrio + 40 min de corrida cromatográfica).
- Análise NIRS: 5 min.

## 8. Comentários adicionais

8.1. Tomar especial cuidado com a amostragem homogênea. Em alguns casos, quando o leite foi armazenado por longos períodos ou o leite é descongelado, ele tende a formar materiais particulados sólidos. Se houver formação de material particulado, agite vigorosamente o recipiente do leite para coletar uma amostra representativa. Caso contrário, descarte a amostra.

8.2. O programa de equilíbrio antes de cada execução de amostra é estritamente necessário para obter uma separação bem-sucedida das proteínas do leite.

Portanto, é necessário identificá-las e quantificá-las de forma eficiente no leite de diferentes espécies de ruminantes. Entre os ruminantes, o búfalo tem sido objeto de especial atenção mundial...

8.3. Verifique os limites máximos de fluxo de sua coluna antes de usá-la. Considere, que o programa envolve um fluxo máximo de 2,0 mL/min, o qual pode ser superior ao limite máximo de uma coluna diferente à proposta neste protocolo.

8.4. Se o seu equipamento de HPLC não contém um módulo de amostrador automático com refrigeração, você pode usar um refrigerador convencional e injetar as amostras manualmente. As amostras processadas devem ser armazenadas a 4 °C.



## 9. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo apoio financeiro para desenvolver esta metodologia.

## 10. Referências

- Bonfatti, V; Giantin, M; Rostellato, R; Dacasto, M; Carnier, P. (2013). Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC. *Food Chem.* 136(2): 364-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.002.
- Bonfatti, V; Grigoletto, L; Cecchinato, A; Gallo, L; Carnier, P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *J. Chromatogr A.* 1195(1-2):101-6. doi: 10.1016/j.chroma.2008.04.075.
- Evangelista, C; Basiricò, L; Bernabucci, U. (2021). An Overview on the Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) on Farms for the Management of Dairy Cows. *Agriculture.* 11(4):296. doi: 10.3390/agriculture11040296
- Feligini, M; Bonizzi, I; Buffoni, JN; Cosenza, G; Ramunno, L. (2009). Identification and quantification of alphaS1, alphaS2, beta, and kappa-caseins in water buffalo milk by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57(7): 2988-92. doi: 10.1021/jf803653v.
- Fox, PF; McSweeney, PLH. (2003). *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins.* Editora: Kluwer Academic, New York, NY.
- Giannuzzi, D; Mota, LFM; Pegolo, S; Gallo, L; Schiavon, S; Tagliapietra, F; Katz, G; Fainboym, D; Minuti, A; Trevisi, E; Cecchinato, A. (2022). In-line near-infrared analysis of milk coupled with machine learning methods for the daily prediction of blood metabolic profile in dairy cattle. *Sci Rep.* 12(1):8058. doi: 10.1038/s41598-022-11799-0.
- Lima, EM; Vargas, JAC; Gomes, DI; Maciel, RP; Alves, KS; Oliveira, WF; Aguiar, GL; Reis, GC; Oliveira, LRS; Mezzomo, R. (2021). Intake, digestibility, and milk yield response in dairy buffaloes fed *Panicum maximum* cv. Mombasa supplemented with seeds of tropical açai palm. *Trop. Anim. Health Prod.* 53(1): 178. doi: 10.1007/s11250-021-02626-1.

- Melfsen, A; Hartung, E; Haeussermann, A. (2012). Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 95(11): 6465-76. doi: 10.3168/jds.2012-5388.
- Oliveira, WF; Lima, EM; Freitas, DR; Dos Santos, SS; Reis, GC; Gomes, DI; Alves KS; Maciel, RP; Vargas, JAC; Mezzomo, R. (2020). Production, chemical composition, and economic viability of Minas Frescal cheese from buffaloes supplemented with açai seed. *Trop. Anim. Health Prod.* 52(5): 2379-2385. doi: 10.1007/s11250-019-02178-5.
- Patiño, EM; Judis, MA; Negrette, MS; Pochon, DO; Cedres, JF; Rebak, G; Romero, AM; Doval, MM; Crudeli, GA. (2012). Influence of fish oil in the concentration of conjugated linoleic acid and omega 6 and 3 in buffalo milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64, 427-433. doi: 10.1590/S0102-09352012000200024.
- Swaisgood, HE. (1982). Chemistry of milk proteins. In: *Developments in dairy chemistry*. Vol 1. Ed. P.F. Fox, Editora: London: Applied Science Publishers. pp 1-59.
- Tsenkova, R; Atanassova, S; Itoh, K; Ozaki, Y; Toyoda, K. (2000). Near infrared spectroscopy for biomonitoring: cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *J. Anim. Sci.* 78(3): 515-22. doi: 10.2527/2000.783515x.
- Yakubu, HG; Kovacs, Z; Toth, T; Bazar, G. (2022). The recent advances of near-infrared spectroscopy in dairy production-a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62(3): 810-831. doi: 10.1080/10408398.2020.1829540

