

Proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação¹

Raquel F.S. Raimondo^{2*}, Samantha I. Miyashiro², Clara S. Mori² e Eduardo H. Birgel Junior³

ABSTRACT- Raimondo R.F.S., Miyashiro S.I., Mori C.M. & Birgel Junior E.H. 2013. [**Whey proteins from Jersey cows during lactation.**] Proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(1):119-125. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil, E-mail: rfraimondo@gmail.com

To evaluate the whey proteins during the lactation, whey obtained from 48 milk samples collected from 12 Jersey cows before milking were studied. Cows were distributed into three groups as follows: early (30-120 days), middle (121-210 days) and end of lactation (more than 211 days). The proteinogram consisted of total proteins concentration determined by biuret method and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A gradual and significant decrease of some fractions of the whey was observed during the lactation cycle albumin, lactoferrin, immunoglobulins, β -lactoglobulin and α -lactoalbumin. The normal ranges obtained for the whey proteins of Jersey cows were: whey total proteins 569.0 to 713.0mg/dL, lactoferrin 36.0 to 49.0mg/dL, albumin 24.0 to 34.0mg/dL, immunoglobulin's heavy chain 38.0 and 51.0mg/dL; immunoglobulin's light chain 59.0 to 95.0mg/dL, β -lactoglobulin 207.0 to 256.0mg/dL, α -lactoalbumin 117.0 to 157.0mg/dL; protein with 226 KDa 5.80 to 12.0mg/dL, and protein with 118 KDa 2.30 to 6.80mg/dL.

INDEXTERMS: Proteins, polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, β -lactoglobulin, α -lactoalbumin, lactation phase.

RESUMO.- Para avaliar as proteínas do soro lácteo durante a lactação, o soro obtido a partir de 48 amostras de leite coletadas de 12 vacas da raça Jersey antes da ordenha foi estudado. Os animais foram distribuídos em três grupos: terço inicial (30-120 dias de lactação), terço médio (121-210 dias de lactação) e terço final da lactação (mais de 211 dias de lactação). O proteinograma consistiu da concentração de proteína total do soro lácteo, determinado pelo método de biureto e da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A diminuição gradual e significativa de algumas frações do soro de leite foi observada durante a lactação, albumina, lactoferrina, imunoglobulinas, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. Os valores de normalidade obtidos para as proteínas do soro do leite de vacas Jersey foram: pro-

teína total do soro de leite 569,0-713,0mg/dL, lactoferrina 36,0-49,0mg/dL, albumina 24,0-34,0mg/dL, cadeia pesada de imunoglobulina 38,0-51,0 mg/dL; cadeia leve de imunoglobulina 59,0-95,0mg/dL, β -lactoglobulina 207,0-256,0mg/dL, α -lactoalbumina 117,0-157,0mg/dL, proteína com 226 KDa 5,80-12,0mg/dL, e proteína com 118 kDa 2,30-6,80mg/dL.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Proteínas, eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, lactação.

INTRODUÇÃO

As proteínas do leite são, na sua grande maioria, sintetizadas na glândula mamária, durante a galactopoiese, por células secretoras alveolares, ou, em menor quantidade, são de origem plasmática (Schalm et al. 1971). Dentre as frações protéicas, a caseína do leite representa 80 % de toda a proteína (Fonseca & Santos 2000). Neste grupo de proteínas sintetizadas na mama, também, devem ser destacadas as proteínas presentes no soro lácteo como as frações α -lactoalbumina e β -lactoglobulina.

O aumento dos teores de proteína total com diminuição dos teores de caseína e aumento dos teores de proteínas de origem plasmática no soro lácteo representa sintoma

¹ Recebido em 6 de julho de 2012.

Aceito para publicação em 10 de dezembro de 2012.

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo/SP 05508 270, Brasil. E-mail: ehbirgel@usp.br

³ Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), USP, Avenida Duque de Caxias Norte 225, Campus da USP, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil. *Autor para correspondência: rfraimondo@gmail.com

evidente de alteração da glândula mamária (Schalm et al. 1971). Comprovou-se, nas mamites o aumento no soro lácteo dos teores de proteínas de origem plasmática em decorrência das alterações na permeabilidade dos vasos devido ao processo inflamatório (Sant'Ana 2004). Dentre os fatores responsáveis pelas alterações na composição protéica do leite merecem destaque não somente aqueles decorrentes das mamites, mas também, a influência de outros fatores, como os relacionados à fase da lactação.

No estudo do proteinograma do soro lácteo, utilizou-se, inicialmente, a técnica de eletroforese em papel para a separação das frações protéicas (Larson & Kendall 1957) e a partir da pesquisa realizada por Hiller (1976), que descreveu que a técnica poderia ser recomendada, com adequada precisão para a mensuração das frações protéicas do soro lácteo e Basch et al. (1985) adaptaram a técnica descrita por Laemmli (1970) para o uso no leite e derivados confirmando a técnica de eletroforese SDS-PAGE um método eficaz para uso em soro e vários pesquisadores passaram a utilizar a técnica para detecção de proteínas do soro, mesmo aquelas que ocorreriam em pequenas concentrações no soro lácteo (Kato et al. 1989, Urech et al. 1999, Sant'Ana & Birgel 2007, Ferrão et al. 2008, Nacamura et al. 2010)

Após a padronização do método de biureto para determinação da proteína do soro lácteo, a presente pesquisa foi desenvolvida com o intuito de estudar as proteínas do soro de leite de vacas Jersey durante a lactação, através da separação das frações protéicas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE).

MATERIAL E MÉTODOS

Nessa pesquisa foram utilizadas 48 amostras de soro lácteo obtidas do leite de mamas de vacas da raça Jersey criados em sistema semi-extensivo com alimentação baseada em volumoso, suplementada com silagem e concentrado comercial onde se adotava o sistema de ordenha mecânica. As amostras foram colhidas, antes da ordenha. A seleção dos animais foi baseada no exame clínico e no histórico, sendo descartados aqueles que apresentaram episódios recorrentes de mamite, alterações das características macroscópicas do leite, ou alterações na palpação da mama, que pudessem estar relacionadas à existência de um processo inflamatório agudo ou crônico (Birgel 2004).

Após os procedimentos de preparo dos animais para a ordenha, seguia-se a colheita de cerca de 3 ml de leite em tubo de plástico estéril para o exame microbiológico, precedido por assepsia da extremidade do teto, utilizando-se compressas de gaze embebidas em álcool 70%, e em seguida foram colhidos 50ml de leite em frascos de plástico para a obtenção do soro lácteo para o fracionamento das proteínas. As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor refrigeradas com gelo reciclável durante o transporte e, até o momento de serem analisadas.

Primeiramente as amostras colhidas de maneira estéril foram submetidas ao exame microbiológico, semeadas em meio ágar-sangue de carneiro e incubadas a 37°C, sendo realizadas leituras com 24, 48 e 72 horas de incubação. Todas as 48 amostras utilizadas tiveram resultado negativo no exame microbiológico, sendo divididas em três grupos de acordo com a fase de lactação que se encontravam: 16 amostras no terço inicial (30-120 dias de lactação); 16 amostras no terço médio (121-210 dias de lactação) e 16 amostras no terço final de lactação (mais de 210 dias de lactação).

O soro lácteo foi obtido através da coagulação do leite pela adição de 5 % de solução de renina utilizando técnica sugerida por Sant'Ana & Birgel (2003), sendo as amostras turvas submetidas a processo de centrifugação utilizando centrífuga de microtubos durante 20 minutos a 16.000g (13.000 RPM). A proteína total do soro lácteo foi determinada pelo método de Biureto previamente padronizado para o uso em soro lácteo através da equação da reta: Proteína do soro lácteo = (Absorbância 0,005) / 0,050 obtida na confecção da curva padrão. Inicialmente 30 amostras de leite de vacas com grande concentração de proteínas foram selecionadas segundo a fase de lactação, ou seja, fase de secagem e de colostro. O soro lácteo obtido foi centrifugado a 16.000g (13.000rpm) por 20 minutos utilizando centrífuga de microtubos Biofuge Pico da Heraeus Instruments, eliminando a turbidez da amostra evitando interferências na leitura da absorbância. Inicialmente a proteína total do leite foi obtida pelo método de Kjeldhal, padrão ouro, e em seguida dependendo do teor de proteína as amostras foram diluídas em água MiliQ obtendo-se até 10 diluições. As amostras e suas diluições foram analisadas pelo método de Biureto. A proteína das diluições foi calculada a partir do valor da amostra inicial obtido pelo método de Kjeldhal. A curva padrão e a equação da reta foram confeccionadas no programa Excell 2007 a partir das absorbâncias e da proteína obtida pelo método de Kjeldhal. Para assegurar que nenhum outro constituinte do leite pudesse interferir na reação do Biureto, utilizou-se Lactose P.A. da marca Interlab diluída em água MiliQ para obtenção de soluções nas seguintes concentrações 1%, 5%, 10% e amostras de soro lácteo colocadas em água em ebulição a 100°C, por 20 minutos para desnaturar as proteínas. As soluções de lactose e o sobrenadante obtido após a ebulição do soro lácteo foram submetidos ao método de Biureto.

O fracionamento das proteínas do soro de leite foi realizado através da técnica de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) (12 %) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) sistema SDS-PAGE. A corrida de eletroforese foi realizada em cuba vertical no sistema descontínuo, ou seja, com dois géis de poliácridamida de diferentes concentrações, o primeiro gel empilhador (4%) e o segundo gel separador (12%). As proteínas das amostras foram desnaturadas por aquecimento a 100°C na presença de 2-mercaptoetanol e do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Após a aplicação das amostras preparadas no gel, iniciava-se a corrida com corrente de 40mA e, após a passagem das amostras para o gel separador, aumentava-se a corrente elétrica para 50 mA. Após a separação das frações protéicas, os géis eram corados com Coomassie Blue, durante 10 minutos, para a seguir, serem lavadas com solução descorante (metanol e ácido acético glacial).

A seguir, os géis foram escaneados em densitômetro da marca Epson, modelo Epson Expression 1680. A determinação e a quantificação das proteínas pelo peso molecular foram realizadas com o auxílio do programa de computador Life Science Software - Vision Works LS (Image Acquisitions and Analysis Software), da marca UVP através de padrão de peso molecular comercial da marca Bio-Rad®, modelo Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, com 10 bandas de variação entre 250 KDa e 10 KDa e proteínas comerciais purificadas da Sigma® (lactoferrina, albumina sérica, imunoglobulina G bovina, imunoglobulina A humana, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina), corridas juntamente com as amostras.

Para a análise descritiva dos dados foi calculado média e desvio padrão. Para comparação das proteínas do soro lácteo durante as fases de lactação foi utilizado análise de variância (ANOVA) e comparação múltipla com teste de Bonferroni. Para determinar os valores de normalidade para as proteínas em cada momento foi calculado o intervalo de confiança (95%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se as 48 amostras de leite utilizadas, verificou-se que o teor médio de proteína do soro lácteo de vacas da raça Jersey foi igual a 640 ± 250 mg/dL e o intervalo de confiança variou entre 569,0 e 713,0 mg/dL. Esses valores de proteína no soro lácteo são menores do que os obtidos por Larson & Kendall (1957) através da técnica de micro-Kjeldhal e Sant’Ana (2004) através do método de Biureto.

O do uso do método de Biureto (Gornall et al. 1949) na determinação da proteína do soro de leite foi determinado por Johnson & Swanson, (1952), apesar da padronização e confecção de curva padrão realizada pelos autores, uma equação da curva não foi determinada para a aplicação do método para soro lácteo. Sant’Ana (2004) utilizou o método de Biureto através de analisador bioquímico automatizado, contudo não foram encontradas informações referentes a padronização dessa metodologia para a determinação de proteína no soro de leite bovino.

Na presente pesquisa houve preocupação na padronização do método do Biureto, sendo estabelecida curva padrão para a determinação do teor de proteína total do soro lácteo. Na primeira parte dos ensaios para estabelecer a curva-padrão para determinação dos teores de proteína no soro lácteo, verificou-se que os valores de proteína no soro de leite obtidos pelo método de Kjeldhal e de Biureto apresentavam correlação igual a 0,989. De forma similar Keller & Neville (1986), também, haviam relatado uma correlação positiva de 0,96 na comparação das duas metodologias, enquanto Verheul & Cornelissem (1986) utilizando o método de biureto para determinação de proteína em leite humano obtiveram uma curva linear e consideraram a técnica precisa e sensível para concentrações protéicas de até 25g/L e com correlação positiva (0,986) com o método de Kjeldhal. Na segunda parte dos ensaios foi possível observar que não houve influência de outros constituintes do leite no método do Biureto, pois, as soluções de lactose e o sobrenadante obtido após a ebulição do soro lácteo e denaturação das proteínas não reagiram com o Biureto não interferindo na leitura da absorbância

Avaliando a influência da fase de lactação na proteína total do soro de leite observou-se que no terço inicial (810 ± 150 mg/dL) e no terço médio da lactação (730 ± 220 mg/dL) os teores de proteína do soro lácteo (Fig.1) foram maio-

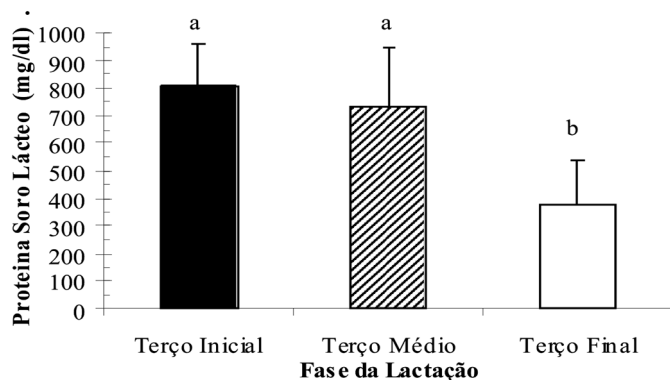
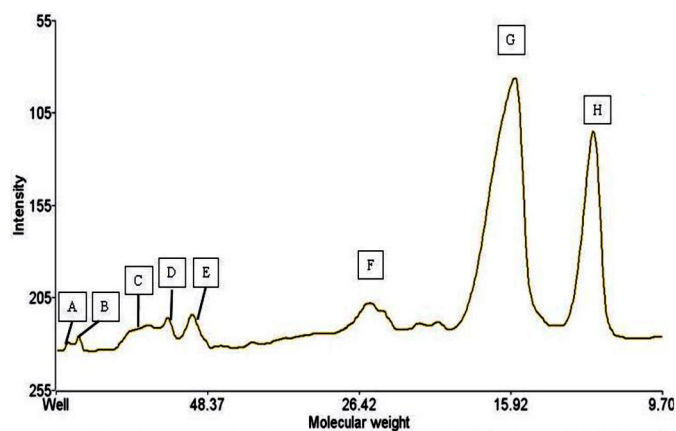


Fig.1. Avaliação da influência da fase da lactação nos teores de proteína no soro lácteo do leite de vacas da raça Jersey. São Paulo, 2009.

res do que os obtidos em amostras colhidas no terço final da lactação (380 ± 160 mg/dL). Apesar do significativo aumento nos teores de proteína no soro lácteo durante a fase colostrar (Sant’Ana & Birgel 2007, Ferrão et al. 2008) e no período de secagem da glândula mamária (Nacamura et al. 2010) serem fatos bem descritos, verificou-se a existência de controvérsias na literatura sobre a natureza dessa influência durante a lactação plena. Sant’Ana & Birgel (2007) não encontraram modificações na composição protéica do soro de leite em vacas Holandesas no terço inicial, médio e final da lactação, enquanto Auld et al. (1995) não observou variações no teor da proteína do soro lácteo em um rebanho, que pudessem ser atribuídas à influência do estágio de lactação, enquanto que em um segundo rebanho, as concentrações de caseína e de proteína total no leite foram maiores no início e no terço final da lactação.

No fracionamento das proteínas do soro de leite das 48 amostras analisadas foram identificadas e quantificadas as seguintes frações protéicas: lactoferrina ($74,26 \pm 5,3$ KDa); albumina ($63,34 \pm 5,12$ KDa); imunoglobulina de cadeia pesada ($52,9 \pm 9,26$ KDa); imunoglobulina de cadeia leve ($24,74 \pm 2,24$ KDa); beta-lactoglobulina ($16,62 \pm 1,55$ KDa) e alfa-lactoalbumina ($13,37 \pm 1,37$ KDa). Afora essas proteínas outras duas frações protéicas com peso molecular de 226 KDa ($226,38 \pm 4,5$ KDa) e peso molecular de 118 KDa ($118,49 \pm 20,9$ KDa) puderam ser observadas, porém a sua identificação não foi possível de ser realizada, bem como o seu significado para interpretação do proteinograma do soro lácteo é desconhecido (Fig.2).

Os resultados obtidos no fracionamento das proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação demonstrou a predominância de duas proteínas, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina que juntas corresponderam a 64,51% das proteínas do soro lácteo. Dentre as proteínas de origem plasmática observou-se que as imunoglobulinas representaram 20,91% das proteínas encontra-



A = proteína de peso molecular de 226 KDa; B = proteína com peso molecular de 118 KDa; C = Lactoferrina; D - albumina sérica; E = imunoglobulina de cadeia pesada; F = imunoglobulina de cadeia leve; G = beta-lactoglobulina; H = alfa-lactoalbumina.

Fig.2. Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação obtida em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE). São Paulo, 2009.

das no soro lácteo, enquanto que os percentuais de lactoferrina e albumina foram respectivamente 6,97% e 5,23% dos valores totais de proteínas do soro lácteo observadas em mamas sadias durante a lactação plena (Fig.3).

Acredita-se que a β -lactoglobulina tenha papel no metabolismo do fosfato na glândula mamária, no transporte de vitamina A e de outras moléculas como ácidos graxos no trato gastrointestinal de neonatos (Sawyer 2003). De acordo com Formaggione et al. (1999) o polimorfismo da β -lactoglobulina está relacionado com alterações nas características físico-químicas da micela de caseína, afetando as propriedades tecnológicas do leite. Verificou-se que os teores médios de β -lactoglobulina no soro lácteo de vacas da raça Jersey foi igual a $230,0 \pm 90,0$ mg/dL (Quadro.1). Com base nos intervalos de confiança obtidos para esta variável, recomenda-se que seja utilizado como referência para os teores de β -lactoglobulina valores entre 207,0 e 256,0 mg/dL.

A α -lactoalbumina juntamente com β 1,4-galactosil-transferase formam o complexo lactose-sintetase no aparelho de Golgi das células mamárias epiteliais regulando a síntese de lactose (Farrell et al. 2004, Bleck et al. 2009). A α -lactoalbumina é encontrada no leite, porque parte é liberada do complexo sintase-lactose durante a lactação normal e é transportada com outros componentes do leite em vesí-

culas dentro da célula secretora do epitélio mamário e, em seguida para dentro do lúmen dos alvéolos (Jenness 1974). Na presente pesquisa foram encontrados teores médios iguais a $140,0 \pm 70,0$ mg/dL (Quadro.1). Considerando-se os intervalos de confiança obtidos para essa variável, recomenda-se que seja utilizado como valores de normalidade para os teores de α -lactoalbumina de 117,0-157,0 mg/dL.

A discrepância dos valores obtidos para os teores de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina na presente pesquisa quando comparados com os obtidos por Sant'Ana & Birgel (2007) foram decorrentes das diferenças na metodologia utilizadas para a determinação da proteína do soro lácteo.

A avaliação da influência da fase de lactação nos teores de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina (Fig.4) demonstrou uma diminuição desses valores com o evoluir da lactação (β -lactoglobulina: terço inicial $280,0 \pm 60$ mg/dL; terço médio $260,0 \pm 60$ mg/dL e terço final $150,0 \pm 70,0$ mg/dL e α -lactoalbumina: terço inicial $190,0 \pm 40,0$ mg/dL, terço médio $150,0 \pm 40,0$ mg/dL e terço final da lactação $70,0 \pm 50,0$ mg/dL).

A função biológica da imunoglobulina é proteger a glândula mamária contra agentes patogênicos causadores de mamites (Marnila & Korhonen 2003). Em virtude da técnica utilizada para a separação das frações protéicas nessa pesquisa, obtiveram-se duas frações de imunoglobulinas, sendo que o teor médio de imunoglobulinas de cadeia pesada foi igual a $40,0 \pm 20,0$ mg/dL e os teores médios de imunoglobulinas de cadeia leve no soro lácteo de vacas da raça Jersey foi igual a $80,0 \pm 60$ mg/dL (Quadro 1). Considerando-se os intervalos de confiança obtidos para essas variáveis, recomenda-se que seja utilizado como valores de normalidade para os teores de imunoglobulinas de cadeia pesada entre 38,0 e 51,0 mg/dL e de imunoglobulinas de cadeia leve entre 59,0 e 95,0 mg/dL.

Houve dificuldade para compará-los aos relacionados na literatura, pois a maioria dos pesquisadores utilizou técnicas imunológicas e apesar de Sant'Ana (2004) ter utilizado a técnica de eletroforese similar ao utilizado na presente pesquisa a autora descreveu a presença de apenas uma fração de imunoglobulina. O uso de 2-mercaptoetanol

Quadro 1. Média, desvio padrão, intervalo de confiança das frações protéicas (lactoferrina; albumina; imunoglobulinas de cadeia pesada; imunoglobulinas de cadeia leve; beta-lactoglobulina; alfa-lactoalbumina)

Fração de proteína	Média \pm Desvio Padrão (mg/dL)	Intervalo de Confiança* (mg/dL)
Proteína 226 KDa	9,0 \pm 10,0	5,80 - 12,0
Proteína 118 KDa	4,5 \pm 8,0	2,3 - 6,8
Lactoferrina	40,0 \pm 20,0	36,0 - 49,0
Albumina sérica	30,0 \pm 20,0	24,0 - 34,0
Imunoglobulina cadeia pesada	40,0 \pm 20,0	38,0 - 51,0
Imunoglobulina cadeia leve	80,0 \pm 60,0	59,0 - 95,0
Beta-lactoglobulina	230,0 \pm 90,0	207,0 - 256,0
Alfa-lactoalbumina	140,0 \pm 70,0	117,0 - 157,0

* Intervalo de confiança, intervalo no qual estão compreendidos 95% dos valores da população.

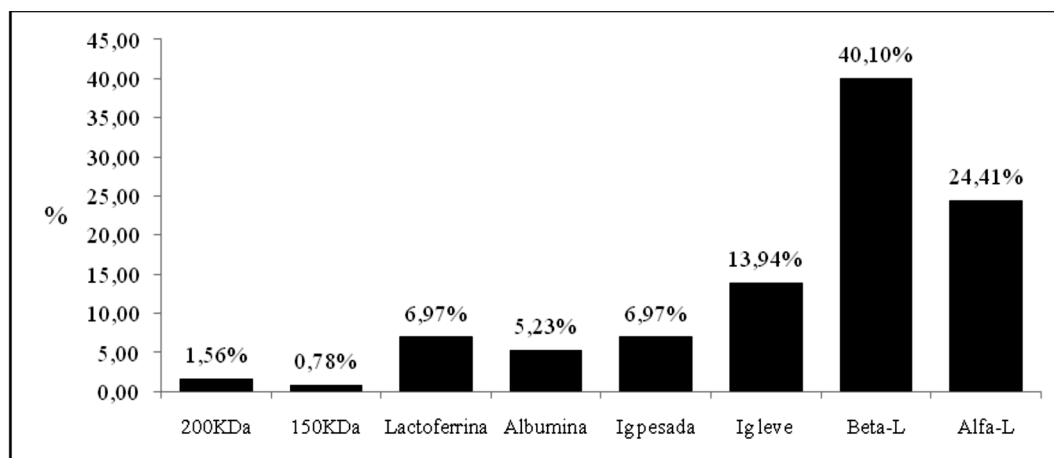


Fig.3. Concentração (%) das proteínas fracionadas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação obtida em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE). São Paulo, 2009.

durante o processamento das amostras submetidas à eletroforese de gel de poli-acrilamida determina desnaturação das proteínas com rompimento das ligações dissulfídicas das imunoglobulinas e, como conseqüência, sua divisão em duas cadeias: imunoglobulinas de cadeia pesada e imunoglobulinas de cadeia leve.

A fase de lactação influenciou os teores de imunoglobu-

linas (Fig.4), sendo observado que no terço inicial (imunoglobulinas de cadeia pesada $50,0 \pm 20,0$ mg/dL, imunoglobulinas de cadeia leve $90,0 \pm 30,0$ mg/dL) e terço médio da lactação (imunoglobulinas de cadeia pesada $50,0 \pm 30,0$ mg/dL, imunoglobulinas de cadeia leve $110,0 \pm 80,0$ mg/dL) os valores eram significativamente maiores do que os observados no terço final da lactação (imunoglobulinas de cadeia

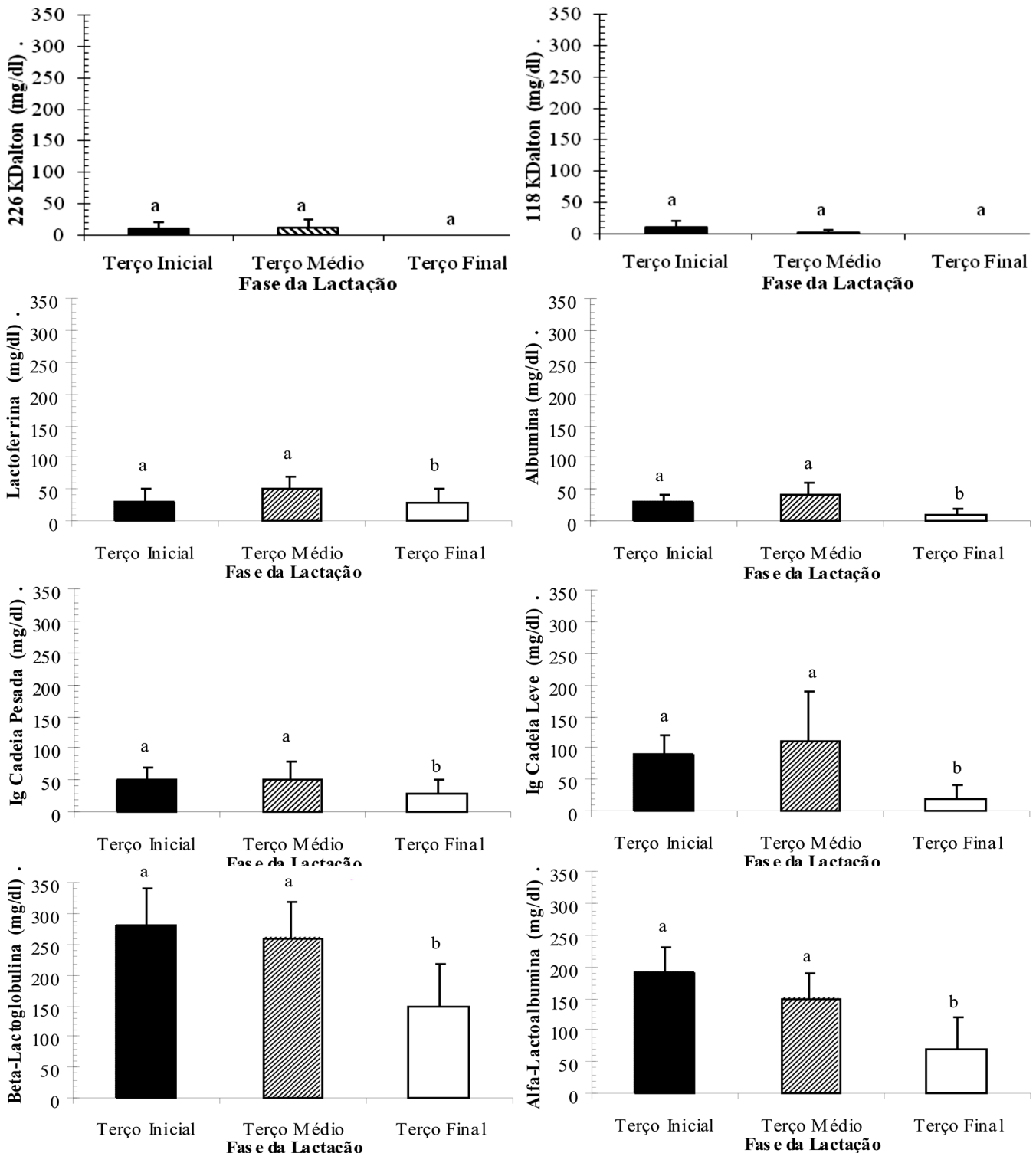


Fig.4. Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do soro lácteo do leite de vacas da raça Jersey. São Paulo, 2009. (a,b) Letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), Teste de Bonferroni).

pesada $30,0 \pm 20,0$ mg/dL, imunoglobulinas de cadeia leve $20,0 \pm 20,0$ mg/dL).

A lactoferrina diante de infecções e inflamações atua como a primeira linha de proteção com ação bacteriostática, pela capacidade de seqüestrar o ferro livre que é um essencial nutriente para a bactéria, e também uma atividade antibacteriana pela habilidade em se ligar a membrana exterior de bactérias Gram-negativas causando a liberação rápida de lipopolissacarídeos e um aumento na permeabilidade da membrana (Farrell et al. 2004). Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, os teores médios de lactoferrina (tab1.) encontrados durante a lactação plena foram iguais a $40,0 \pm 20,0$ mg/dL. Considerando-se os intervalos de confiança obtidos para essas variáveis, recomenda-se que seja utilizado como referência para os teores de lactoferrina valores entre 36,0 e 49,0mg/dL. Estes teores são semelhantes, aos apresentados por Schanbacher & Larry Smith (1974) e Welty et al. (1975) respectivamente iguais a 35mg/dL, 20mg/dL e discordam por serem maiores do que os observados por Hagiwara et al. (2003) que encontraram valores iguais a 17,0mg/dL obtidos pela técnica de imunodifusão radial específica para lactoferrina. Os presentes resultados foram menores do que os valores médios obtidos por Sant'Ana & Birgel (2007) novamente diferença ocasionada pela discrepância obtida nos valores de proteína total do soro.

A fase de lactação influenciou os teores de lactoferrina (Fig.4), sendo observado que no terço inicial ($60,0 \pm 20,0$ mg/dL) e terço médio da lactação ($50,0 \pm 20,0$ mg/dL) os valores eram significativamente maiores do que os observados no terço final da lactação ($30,0 \pm 20,0$ mg/dL).

A albumina sérica encontrada no leite é fisiologicamente e imunologicamente idêntica a do sangue (Farrell et al. 2004) e as suas concentrações são relacionadas a diversos fatores fisiológicos e patológicos da glândula mamária quando ocorre aumento da permeabilidade vascular devido a processos inflamatórios (Schalm, et al. 1971). Recentemente Shamay et al. (2005) mostrou que existe síntese de albumina pelo tecido mamário, sendo que situações em que haja processo inflamatório como nas mamites e no período seco poderia haver substancial aumento da sua secreção pela glândula mamária. Os teores médios de albumina sérica (Quadro 1) encontrados na presente pesquisa foram iguais a $30,0 \pm 20,0$ mg/dL. Considerando-se os intervalos de confiança obtidos para essa variável, recomenda-se que seja utilizado como referência para os teores de albumina valores entre 24,0 e 34,0mg/dL. Estes resultados assemelham-se aos mencionados por Schalm et al. (1971) que utilizaram técnica semi-quantitativa pouco específica, e obteve o valor de 40mg/dL, e discordam de Sant'Ana & Birgel (2007) que encontraram valor médio de albumina sérica igual a $70,70 \pm 21,06$ mg/dL. A fase de lactação (Fig.4) influenciou os teores de albumina sérica, sendo observado que no terço inicial ($30,0 \pm 10,0$ mg/dL) e terço médio da lactação ($40,0 \pm 20,0$ mg/dL) os valores foram significativamente maiores do que os observados no terço final da lactação ($10,0 \pm 10,0$ mg/dL).

Agradecimentos.- À FAPESP, pelo auxílio pesquisa nº 2008/04109-9 e bolsa de doutorado processo nº 06/61571-1

REFERÊNCIAS

- Auldism M., Coats S., Rogers G. & McDowell G. 1995. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Aust. J. Exp. Agric.* 35:427-436.
- Basch J.J., Douglas Jr F.W., Procino L.G., Holsinger V.H. & Farrell Jr H.M. 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *J. Dairy Sci.* 68:23-31.
- Birgel E.H. 2004. Semiologia da glândula mamária de ruminantes, p.353-399. In: Feitosa F.L. (Ed.), *Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico*. Roca, São Paulo.
- Bleck G.T., Wheeler M.B., Hansen L.B., Chester-Jones H. & Miller D.J. 2009. Lactose synthase components in milk: Concentrations of α -lactalbumin and β 1,4-galactosyltransferase in milk of cows from several breeds at various stages of lactation. *Reprod. Domest. Anim.* 44:241-247.
- Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F. & Swaisgood H.E. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth Revision. *J. Dairy Sci.* 87:1641-1674.
- Ferrão J.S.P., Raimondo R.F.S., Nacamura C.S. & Birgel Junior E.H. 2008. Avaliação da influência da fase colostrar no proteinograma do soro lácteo de bovinos da raça Jersey, criados no estado de São Paulo. *Anais 16º Simpósio de Iniciação Científica da USP (SIICUSP)*, Piracicaba, p.1 (Resumo)
- Fonseca L.F.L. & Santos M.V. 2000. *Qualidade do leite e controle da mastite*. Lemos Editorial, São Paulo, p.175
- Formaggioni P., Summer A., Malacarne M. & Mariani P. 1999. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *Bos genus*. *Anais XIX Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Parma, Italia*, p.1. (Resumo)
- Gornall A.G., Bardawill C.J. & David M.M.J. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766.
- Hagiwara S., Kawai K., Anri A. & Nagahata H. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J. Vet. Med. Sci.* 65:319-323.
- Hillier R.M. 1976. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide-gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 43:259-265.
- Jenness R. 1974. The composition of milk, p.3-107. In: *Ibid.* (Eds), *Lactation*. Academic Press, New York.
- Johnson B.B. & Swanson A.M. 1952. Milk serum proteins. I. A quantitative biuret test for milk serum proteins. *J. Dairy Sci.* 35:823-828.
- Kato K., Mori K. & Katoh N. 1989. Different protein patterns in normal and mastitic milks as revealed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nippon Juigaku Zasshi* 51:1275-1278.
- Keller R.P. & Neville M.C. 1986. Determination of total protein in human milk: Comparison of methods. *Clin. Chem.* 32:120-123.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larson B.L. & Kendall K.A. 1957. Protein production in the bovine: Daily production of the specific milk proteins during the lactation period. *J. Dairy Sci.* 40:377-386.
- Marnila P. & Korhonen H. 2003. Immunoglobulin, p.1950-1956. In: Roginski H., Fuquay J.W. & Fox P.F. (Eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, Werribee.
- Nacamura C.S., Raimondo R.F.E.S., Birgel D.B. & Júnior E.H.B. 2010. Proteinograma do soro lácteo de bovinos da raça Holandesa durante o processo de secagem da glândula mamária. *Anais 18º Simpósio de Iniciação Científica da USP (SIICUSP)*, Piracicaba, p.1. (Resumo)
- Sant'Ana V.A.C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese de Doutorado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo. 161p.
- Sant'Ana V.A.C. & Birgel E.H. 2007. Influência da fase de lactação no proteinograma do leite de vacas sadias. *Archs Vet. Sci.* 12(Supl.):152.
- Sant'Ana V.A.C. & Birgel E.H. 2003. Obtenção do soro lácteo para o fracionamento

- namento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Anais 9º Congresso Latinoamericano de Buiatria, Salvador, p.31. (Resumo)
- Sawyer L. 2003. Beta-lactoglobulin, p.319-386. In: Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Eds), *Advanced Dairy Chemistry. Vol.1. Protein*. Kluwer Academic, Cork.
- Schalm O W., Carroll E.J. & Jain N.C. 1971. *Bovine Mastitis*. Lea and Febiger, Philadelphia, p.360
- Schanbacher F.L. & Larry Smith K. 1974. Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: relation to mammary function. *J. Dairy Sci.* 58:1048-1062.
- Shamay A., Homans R., Fuerman Y., Levin I., Barash H., Silanikove N. & Mabjeesh S.J. 2005. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 88:569-576.
- Urech E., Puhán Z. & Schällibaum M. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 82:2402-2411.
- Verheul F.E.A.M. & Cornelissem P.J.H.C. 1986. More on determination of total protein in human milk. *Clin. Chem.* 32:2003-2004.
- Welty F.K., Larry Smith K. & Schanbacher F.L. 1975. Lactoferrina concentration during involution of bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 9:224-231.