

DETERMINAÇÃO DO POLIPEPTÍDEO RICO EM PROLINA (PRP): PESQUISA DE METODOLOGIA EM LATICÍNIOS PARA FUTURA UTILIZAÇÃO EM LEITE HUMANO

Determination of a proline-rich polypeptide (PRP): methodology research in dairy products for future use in human milk

Karina Merini TONON¹
Mercedes Gabriela Ratto REITER²
Mauro SCHARF³

SUMÁRIO

Vários estudos identificaram a presença de um polipeptídeo rico em prolina (PRP) no leite de ovelha e de vaca e estudos subsequentes comprovaram o seu efeito positivo no tratamento do Alzheimer. Este trabalho teve como objetivo investigar uma metodologia viável para determinar a presença do aminoácido prolina em produtos lácteos como leite, queijo e iogurte, para futura utilização em leite humano.

Termos para indexação: prolina; produtos lácteos; alzheimer.

1 INTRODUÇÃO

Vários estudos demonstram a eficácia do aleitamento na promoção de saúde da criança e reconhece o leite humano como o alimento completo e ideal para os bebês. Os conhecimentos científicos atuais permitem considerar o leite humano como o único alimento capaz de atender de maneira adequada a todas as peculiaridades fisiológicas do metabolismo dos lactentes, estando totalmente adaptado às suas necessidades (RAMOS; ALMEIDA, 2003).

Quando não há uma boa nutrição no início da vida do bebê, os danos que resultam dessa prática podem ser irreversíveis, e podem levar ao atraso no desenvolvimento da criança, como também alterar o seu potencial de crescimento (CARVALHO; TAMEZ, 2005).

A composição do leite humano é muito variada e pode ser influenciada por diversos

fatores como a genética, a nutrição materna e o período de lactação. Também ocorrem variações entre grupos étnicos e entre mulheres. Em uma mesma mulher, são registradas variações no decorrer da lactação, ao longo do dia e durante uma mesma mamada (PICCIANO, 2001; EMMETT; ROGERS, 1997; CONI et al, 1990).

O colostro é um fluido secretado pela glândula mamária na primeira semana após o parto, que possui dez vezes mais caroteno do que o leite maduro, o que lhe confere uma cor amarelo intensa (PATTON et al., 1990). Fornece ao recém nascido grandes quantidades de anticorpos maternos, o que é particularmente importante, uma vez que o sistema imune da criança não está completamente desenvolvido nos primeiros meses (THAPA, 2005). Possui imunoglobulinas, principalmente IgG e IgA secretora, que são derivadas do soro e sintetizadas na glândula mamária. A

1. Acadêmica do Curso de Nutrição, Bolsista PIPE / FURB. Rua São Paulo, 2171. Campus III. Itoupava Seca. CEP 89030-000. Blumenau, SC. Endereço eletrônico kari.tonon@gmail.com
2. Prof. Dra. Universidade Regional de Blumenau. Rua São Paulo, 2171. Campus III. Itoupava Seca. CEP 89030-000. Blumenau, SC. Endereço eletrônico mercedes@furb.br / mercedes.gabriela@terra.com.br
3. Prof. Dr. Universidade Regional de Blumenau. Rua Antônio da Veiga, 140 Campus I. Victor Konder. CEP 89012-900, Blumenau – SC. Endereço eletrônico mscharf@furb.br

IgA secretora é formada por componentes antigênicos e secretor, sendo sintetizada a partir de duas moléculas de IgA séricas ligadas por pontes de dissulfeto. A concentração da imunoglobulina secretora é elevada no colostro, e por ser estável a pH baixo e resistente a enzimas proteolíticas, sobrevive no intestino da criança amamentada com leite materno, fornecendo uma defesa contra infecções causadas pela invasão da mucosa por vírus ou bactérias (WORTHINGTON– ROBERTS; WILLIAMS, 1997).

As proteínas possuem importante papel na nutrição do recém-nascido. Muitas delas devido à função imunoprotetora. O leite humano é o que contém o menor teor de proteínas, sendo o teor maior no colostro. As proteínas do leite são divididas em caseína e proteínas do soro. A maior quantidade de proteínas do leite de vaca (82%) está na forma de caseínas, enquanto que no leite humano maduro o teor dessas proteínas não ultrapassa 25% do teor total. A caseína é uma proteína importante como provedora de aminoácidos livres ao lactente, além de cálcio e fósforo que são constituintes de suas micelas. Já as proteínas do soro do leite como lactoferrina e imunoglobulinas, são essenciais para a proteção do recém nascido (HARTMANN et al., 2001; NEVILLE et al., 2001).

Alguns estudos identificaram uma determinada proteína conhecida como *proline rich polypeptide* (PRP) em colostro de ovelha. Esta proteína, com suas propriedades imunorregulatórias e procognitivas, teria provocado efeitos positivos no tratamento do mal de Alzheimer. A pesquisa de Leszek et al. (2002), estudou 33 pacientes portadores de Alzheimer tratados com PRP por 16 meses. Os resultados mostraram que a PRP induziu melhora ou estabilização estatisticamente significativa no estado de saúde dos pacientes estudados.

Durante estudos sobre imunoglobulinas do colostro de ovelha, observou-se que a IgG2 isolada por cromatografia estava "contaminada" por uma proteína que continha grande proporção de resíduos de prolina. O

material contaminante foi separado e identificado como um *proline rich polypeptide* (PRP) (JANUSZ et al., 1974). Em seus estudos, Schade e Reinhart (1970) identificaram um PRP em leite humano quando testavam suas propriedades como meio de cultura para microrganismos. Observaram que a proteína era um precipitado a temperatura ambiente e solúvel a 4°C. Devido ao seu comportamento em relação à mudança de temperatura, nomearam-na "galactothermin".

Entretanto, pesquisas recentes têm estudado somente a PRP em colostro ovino ou bovino. Sabe-se que o colostro humano também possui maior proporção protéica em relação ao leite de transição e o leite maduro.

Portanto, esta pesquisa objetivou investigar uma metodologia em laticínios para futura investigação da presença ou ausência de prolina em colostro/leite humano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente seria investigada a existência de uma proteína denominada polipeptídeo rico em prolina (PRP) em leite humano, cujas propriedades funcionais anti-Alzheimer têm despertado grande interesse científico. O método utilizado foi o descrito por Bergman e Loxley (1970) para a determinação total do aminoácido prolina através de espectrofotometria. O presente trabalho permitiu a avaliação da espectrofotometria como método de análise de constituintes do leite para futuros estudos, bem como o treinamento de acadêmicos para a realização destas análises.

Para a adaptação da técnica de pesquisa e para possibilitar uma prévia noção da existência ou não deste aminoácido em leite e produtos lácteos, com o intuito de evitar o desperdício de leite humano, já escasso nos bancos de leite, a pesquisa de prolina foi realizada em leite de vaca e derivados.

As análises foram realizadas no Laboratório de Química Geral no *Campus I* da Universidade Regional de Blumenau.

O procedimento da análise consistiu em hidrolisar as amostras com ácido clorí-

drico 6 mol/L por 7 dias, diluir a 200mL e pipetar 5 mL de cada amostra em tubos de ensaio de 30mL, adicionar 1mL de nitrito de sódio 1,25M preparado na hora do procedimento, agitar e deixar em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1mL de cloreto de amônia 1,25M em cada tubo, agitado e acrescentado 5mL de ácido clorídrico concentrado, novamente agitado e aquecido por 20 minutos em banho-maria. Após isso, as amostras eram resfriadas e acrescidas de 5mL de hidróxido de sódio 10 mol/L, e o conteúdo de cada tubo foi diluído até 25 mL com água destilada e 1mL de cada tubo foi pipetado em tubos de ensaio com tampa para o procedimento de coloração.

2.1 Coloração e espectrofotometria

Para o procedimento de coloração foi adicionado 1ml de solução tampão fosfato e 2mL de solução de ninidrina em cada tubo, agitado e colocado em banho-maria e fechando os tubos depois de 15 segundos de aquecimento. Os tubos foram deixados em banho-maria por 100 minutos e resfriados. Em seguida, o conteúdo dos tubos foram transferidos para um frasco de 50mL e o volume foi completado com ácido acético glacial. Por fim, as absorbâncias das soluções resultantes foram medidas no comprimento de onda de 512nm em até 4 horas após o procedimento de diluição.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do método de Bergman e Loxley (1970) foram estudadas as adaptações necessárias para a aplicação desta metodologia em produtos lácteos, como leite humano. As amostras foram definidas e foram iniciados os testes da metodologia.

Para a realização da curva de prolina foram utilizadas diluições de 50µg/ml a 250µg/ml. O método descrito por Bergman e Loxley (1970) se mostrou eficaz para a realização da curva de prolina, conforme a figura 1.

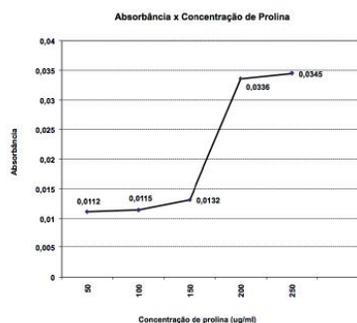


Figura 1. Curva de concentração de prolina

Inicialmente foram analisadas amostras constituídas de 0,5g, 1,0g e 2,0g de leite em pó a fim de investigar a presença de prolina. Entretanto, nas amostras analisadas, não houve confirmação de existência do aminoácido pesquisado.

Foram então analisadas separadamente amostras de iogurte (0,5g) e queijo (0,5g) para identificar a presença de prolina nestes produtos lácteos. Para cada amostra foram utilizados dois tubos de ensaio, sendo que um deles foi dopado com solução padrão de prolina. O aminoácido não foi encontrado nos tubos com a amostra pura e dopada.

No estudo de Davis et al., (1994), que comparou o perfil de aminoácidos do leite humano com o de demais espécies, incluindo primatas e não-primatas, o leite humano obteve a menor concentração de aminoácidos totais enquanto o leite de ratas, obteve a maior concentração. No geral, os aminoácidos mais abundantes em todas as espécies estudadas foram o glutamato, leucina e prolina. O leite humano, juntamente com o de gatas e de éguas, teve a menor concentração de prolina, enquanto os leites de porca e de cabra obtiveram as maiores. Isso explica o fato da maioria dos estudos sobre o polipeptídeo rico em prolina (PRP) terem sido realizados com leite de cabra ou ovelha.

A prolina é um aminoácido não essencial, descoberta em 1901 por Fischer nas caseínas e na albumina de ovo. Muitas pro-

teínas contêm 4 -7% de prolina. São muito ricas neste aminoácido as proteínas do trigo (10,3%), a gelatina (12,8%) e as caseínas (12,3%) (BELITZ; GROSCH, 1997).

4 CONCLUSÃO

Apesar de não ter sido encontrada evidência da existência de prolina nos produtos lácteos pesquisados, não foi possível chegar a uma conclusão sobre a inexistência do mesmo nas amostras analisadas. A prolina pode se comportar de forma diferente conforme as características do meio onde se encontra, e em virtude disso, mesmo que possivelmente estivesse presente nas amostras, não teria sido detectada pelo método utilizado.

Muitas vezes, a escolha do método de pesquisa é baseada na popularidade do mesmo, principalmente em pesquisas de determinação de proteínas. Isso acontece devido à falta de trabalhos de comparação de metodologias. Portanto, acredita-se que muitos trabalhos deste tipo devam ainda ser desenvolvidos.

SUMMARY

Some studies had identified the presence of a proline-rich polypeptide (PRP) in sheep and cow milk and subsequent studies had proven its positive effect in the treatment of the Alzheimer Disease. This work had as objective to research a viable methodology to determine the presence of the proline amino acid in dairy products as milk, cheese and yoghurt, for future use in human milk.

Index Terms: proline; dairy products; alzheimer.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2ed. Ed. Acribia: Zaragoza, 1997.

BERGMAN, I. LOXLEY, R. New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates. **Analytical Chemistry**.1970,42(7),702-706. DOI:10.1021/ac60289a036.

CARVALHO, M.R.; TAMEZ, R.N. **Amamentação: bases científicas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005.

CONI, E.; STACCHINI, A.; CAROLI, S.; FALCONIERI, P. Analytical approach to obtaining reference values for minor and trace elements in human milk. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 5, p. 581-586, 1990.

DAVIS, T. A.; NGUYEN, R. G. B.; FIOROTTO, M. L.; JACKSON, E. M.; LEWIS, D. S.; LEE, D. R.; REEDS, P. J. Amino acid composition of human milk is not unique. **J. Nutr.** 124: 1126-1132, 1994.

EMMETT, P.M.; ROGERS, I.S. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. **Early Hum. Dev.**, v. 49, p. 7-28, 1997.

HARTMANN, P. E.; CREGAN, M. D.; MITOULAS, L. R. Maternal modulation of specific and non-specific immune components of colostrum and mature milk. **Adv Nutr Res**. 2001;10:365-87.

JANUSZ, M.; LISOWSKI, J.; FRANĚK, F. Isolation and characterization of a proline-rich polypeptide from ovine colostrum. **Febs letters**, vol.49,n.2,1974.

LESZEK, J.; INGLLOT, A.; JANUSZ, M.; BYCZKIEWICZ, F.; KIEJNA, A.; GEORGIADES, J.; LISOWSKI, J. Colostrin proline-rich polypeptide complex from ovine colostrum: a long-term study of its efficacy in Alzheimer's disease. **Med Sci Monit** 2002;8(10): PI 93-96 Manuscript ID: 4860.

NEVILLE, M.; MORTON, J.; UMEMURA, S. Lactogenesis: The Transition from Pregnancy to Lactation. **Ped. Clin. North America**, Vol.48, Issue 1, 2001.

PATTON, S.; CANFIELD, L.M.; HUSTON, G.E.; FERRIS, A.M.; JENSEN, R.G. Carotenoids of human colostrum. **Lipids.**, Vol. 25, n.3, p.159-165. Mar, 1990.

PICCIANO, M.F. Nutrient composition of human milk. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 48, n. 1, p. 53-67, 2001.

RAMOS, C. V.; ALMEIDA, J. A. G. Alegações maternas para o desmame: estudo qualitativo. **J. de Pediatr.**, Rio de Janeiro, v.79, n. 5, p.385-390, 2003.

SCHADE, A. L.; REINHART, R. W. Galactothermin, a Reversibly Heat-Precipitable Protein of Human Milk at Neutral pH. **Biochem. J.**, v. 118, 1970.

THAPA, B.R. Health factors in colostrum. **Indian J. Ped.** Vol.72, n.7, Jul, 2005.

WORTHINGTON-ROBERTS, B. S.; WILLIAMS, S. R. Human milk composition and infant growth and development. **Nutrition in Pregnancy and Lactation**, Brown and Benchmark Publishers, U.S.A. pp. 345–391, 1997.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Regional de Blumenau pela bolsa de Iniciação científica do Programa PIPE.