

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS

VANEIDA MARIA MEURER

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM GEL DE
POLIACRILAMIDA UREIA-PAGE E *LAB-ON-A-CHIP* PARA A DETECÇÃO DE
FRAUDE DO LEITE DE CABRA PELA ADIÇÃO DE LEITE BOVINO**

Juiz de Fora
2014

VANEIDA MARIA MEURER

ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA UREIA-PAGE E *LAB-ON-A-CHIP* PARA DETECÇÃO DE FRAUDE DO LEITE DE CABRA PELA ADIÇÃO DE LEITE BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Fonseca Martins

Co-orientadora: Dr^a Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos

**Juiz de Fora
2014**

Meurer, Vaneida Maria.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA UREIA-PAGE E LAB-ON-A-CHIP PARA A DETECÇÃO DE FRAUDE DO LEITE DE CABRA PELA ADIÇÃO DE LEITE BOVINO /

Vaneida Maria Meurer. -- 2014.

94 p. : il.

Orientador: Profa. Dra. Marta Fonseca Martins

Coorientador: Drª Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2014.

1. Leite . 2. Fraude nos alimentos. 3. Lab on a chip. 4. UREIA-PAGE. I. Fonseca Martins, Profa. Dra. Marta , orient. II. Siqueira de Oliveira dos Santos, Drª Alessa , coorient. III. Título.

VANEIDA MARIA MEURER

ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA UREIA-PAGE E *LAB-ON-A CHIP* PARA DETECÇÃO DE FRAUDE DO LEITE DE CABRA PELA ADIÇÃO DE LEITE BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Dissertação aprovada em: 31/01/2014

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. ANTONIO SILVIO DO EGITO
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS

PROF. DR. MARCO ANTÔNIO MOREIRA FURTADO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PROF^a. DR^a. MARTA FONSECA MARTINS
EMBRAPA GADO DE LEITE

Dedico esse trabalho ao meu filho Victor Hugo, que me despertou o maior amor que sinto, incentivando-me a estudar, a atualizar e a enfrentar sempre os desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é misericordioso e que, na sua infinita bondade, nos provê todos os recursos necessários para concluir um empreendimento quando nos propomos a fazê-lo.

Aos meus pais, Alanir e Luiz pelo dom da vida e pelo amor. Em especial a minha mãe, pelo apoio incansável durante todos estes anos de luta e crescimento.

Ao meu esposo e amigo Ronan, por todo amor, compreensão, paciência, apoio e ajuda durante todo o período do mestrado.

Aos meus irmãos, e toda minha família pela constante convivência e amizade.

À Prof.^a Dr.^a Celia Hitomi Yamamoto, pelo incentivo, carinho, amizade e compreensão nos momentos de ausência do laboratório.

Agradeço também a minha amiga e co-orientadora Dr.^a Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, escolhida por Deus, que pela sua capacidade, conhecimento, disciplina, amizade e alegria, soube me conduzir com maestria na realização deste trabalho. Serei eternamente grata a você.

À Prof.^a Dr.^a Marta Fonseca Martins, pela orientação e dedicação, por ter-me proporcionado grandes oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado pela orientação, apoio e principalmente pela amizade em todos estes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Antonio Silvio do Egito pela orientação e apoio durante a realização desta pesquisa.

À Marissa pelos ensinamentos e ajuda durante a execução dos géis.

A todos os meus colegas de laboratórios da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e da Embrapa Gado de Leite, pelo convívio e pela amizade.

Às amigas Sandra Olivia Guerra Pires e Daniela de Sales Guillarducci pela amizade e por estarem presentes no laboratório quando precisei ausentar.

À amiga do curso de mestrado e da UFJF, Martha Eunice de Bessa, pela amizade temperada com tensões e alegrias.

Aos colegas do mestrado, pela troca de experiências profissionais.

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos transmitidos.

À UFJF, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, à Embrapa Gado de Leite e ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao convênio EMBRAPA/MONSANTO que contribuiu com auxílio financeiro para realização dessa pesquisa.

À Laiteria Cabriola e à Joana Casali Meirelles de Souza, por gentilmente ceder as amostras de leite de cabra, proporcionando a realização deste trabalho

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Se um dia você estiver que escolher entre o mundo e o amor, lembre-se: Se escolher o mundo ficará sem amor, mas se escolher o amor, com ele conquistará o mundo.

Albert Einstein

RESUMO

O leite é um alimento de grande relevância na alimentação humana. Não obstante, dos diferentes setores da indústria alimentícia, o setor de laticínios destaca-se por estar entre os mais expressivos economicamente no Brasil. O leite de vaca, o mais consumido, pode ser substituído pelo leite de cabra principalmente porque este apresenta maior digestibilidade e baixo potencial alergênico. No entanto, uma prática fraudulenta consiste na adulteração do leite caprino com leite bovino. Dentre alguns fatores que contribuem para tal, estão o menor rendimento na produção de leite de cabra, em conjunto com o preço mais baixo do leite de vaca. O presente estudo objetivou avaliar as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de ureia (UREIA-PAGE) e eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip*, a fim de caracterizar o perfil proteico do leite de cabra e vaca e estabelecer técnicas rápidas e eficientes para detecção de fraude no leite de cabra. A detecção da fraude no leite de cabra por adição do leite de vaca foi testada pelo perfil eletroforético das proteínas usando os dois métodos citados acima. Os dois métodos avaliados mostraram que a fração α_{S1} - caseína bovina pode ser utilizada como um marcador para detecção desta fraude. Com a técnica de UREIA-PAGE foi possível detectar a presença da α_{S1} -caseína do leite bovino a partir de 2% de leite bovino adicionado ao leite caprino. Entretanto com a técnica *lab-on-a-chip* só foi possível detectar a partir de 20% de adição. Pelo método de eletroforese microfluídica foi possível visualizar o perfil proteico do leite das diferentes espécies (bovino e caprino) traçando seus respectivos perfis eletroforético, com disponibilização rápida dos resultados. O que permite uma investigação de fraude de leite para laboratórios de rotina por meio de um método rápido, já que todo o procedimento dura cerca de 4 horas e permite um grau de automação maior. Devido à necessidade de técnicas eficientes, rápidas, automatizadas para atender a demanda da indústria de laticínios e dos órgãos de fiscalização, faz-se necessário o aperfeiçoamento da técnica *lab-on-a-chip* com o intuito de melhorar seu desempenho e aplicabilidade, possibilitando a detecção de níveis mais baixos de fraude.

Palavras-chave: Análise de proteína do leite, eletroforese microchip, gel de poliacrilamida, adulteração.

ABSTRACT

Milk is a food of great relevance in human nutrition. In addition, among the different food industries in Brazil, the dairy industry is one of the economically expressive. Cow's milk was be substituted for goat's milk in any situation. The goat's milk presents better digestibility and low allergenic potential. However, it is common adulteration of goat milk with cow's milk. Some factors like low income of goat milk and the lower price of cow's milk contribute for this kind of fraud. The present study aimed to evaluate polyacrylamide gel electrophoresis techniques in presence of urea (UREA-PAGE) and microfluidic *lab-on-a-chip*, in order to characterize the protein profile of milk in the different species goat and cow. In addition, establish faster and efficient techniques for fraud detection in goat's milk. The fraud detection in goat's milk by the addition of cow milk was analyzed using the electrophoretic profiles of the proteins by the polyacrylamide gel electrophoresis methods UREA-PAGE and microfluidic *lab-on-a-chip* electrophoresis. Both studied methods showed the α_{s1} - casein bovine as a marked for this fraud detection. The UREA-PAGE techniques detected the bovine's milk α_{s1} - casein from 2% of cow milk added to caprine milk. However *lab-on-a-chip* technique detected bovine's milk α_{s1} - casein from 20% of addition. The microfluidic electrophoresis in microchip allowed the separation of the milk's proteins from the both species tracing their respective electrophoretic profiles with fast results availability; this method has great relevance in milk's fraud investigations in routine labs. The use of lab-on-a-chip has resulted in the rapid procedures as the run time is about four hours. Due to the need for automated, fast and efficient techniques to attend the dairy industry and the regulatory agencies request, it's necessary the development of the *lab-on-a-chip* technique in order to improve their performance and applicability.

Keywords: Milk proteins analysis, Microchip electrophoresis, Urea polyacrylamide gel electrophoresis, adulterations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil eletroforético de migração das principais proteínas do leite de diferentes espécies. CNe-caseína de égua. CNv-caseína de vaca. CNh-caseína humana.CNc-caseína de cabra. CNp-caseína de porca. CNca-caseína de camela.....	24
Figura 2 - Principais alimentos alvos de fraudes.....	31
Figura 3 - Representação dos poços e canais de um <i>chip lab-on-a-chip</i> do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer para análise de proteínas.....	45
Figura 4 - Aplicação das amostras no chip do equipamento Chip Priming Station	46
Figura 5 - Equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer.....	47
Figura 6 - Equipamento para eletroforese SIGMA modelo Z35280-2.....	52
Figura 7 - Curva de calibração da proteína padrão BSA obtida pelo método de Bradford.....	53
Figura 8 - Perfil da corrida eletroforética do padrão de caseínas visualizado no eletroferograma pela tecnologia <i>lab-on-a-chip</i> . β -CN, α_{s1} -CN, e k-CN	55
Figura 9 - Perfil da corrida eletroforética de amostra de leite de cabra visualizado no eletroferograma pela tecnologia <i>lab-on-a-chip</i> . α -LA, β -LG, β -CN e α_{s1} -CN caprina	55
Figura 10 - Perfil da corrida eletroforética de amostra de leite de vaca visualizado no eletroferograma pela tecnologia <i>lab-on-a-chip</i> . α -LA, β -LG, β -CN, α_{s1} -CN bovina, k-CN bovina	56
Figura 11 – Sobreposição dos eletroferogramas de amostras de leite de cabra puro (linha vermelha) e leite de vaca puro (linha azul), comparando as diferenças entre as amostras	56
Figura 12 - Eletroferograma de amostra de leite de cabra puro e de misturas crescentes de leite bovino no leite caprino utilizando a tecnologia <i>lab-on-a-chip</i>	57
Figura 13 - Demonstração gráfica da regressão linear obtida pela porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.....	62

Figura 14 - Demonstração gráfica da regressão linear entre a área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.....	64
Figura 15 – Distribuição da média das áreas ocupadas pelas proteínas utilizando amostras de leite de cabra puro, leite de vaca puro e misturas crescentes de adição de leite bovino ao leite caprino obtida pela tecnologia <i>lab-on-a-chip</i>	66
Figura 16 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida (12,5%) das amostras de leite de vaca, leite de cabra.	69
Figura 17 – Comparação do perfil eletroforético do leite de cabra e leite de vaca em gel de poliacrilamida.....	71
Figura 18 - Densitogramas do leite de cabra de amostras de leite de cabra adicionado com leite de vaca em gel poliacrilamida UREIA-PAGE.....	72
Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com ureia de amostras de leite de cabra adicionado com leite de vaca Leite de Cabra Cru (0%): a. 1-3, b. 10-12, c. 1-3, d. 10-12, f. 7-9, g. 1-3, i. 1-3 Leite de vaca Cru (100%): a. 10-12, b. 1-13, c. 10-12, d. 1-3, e. 1 -3, f. 1-3, g. 7-9, h. 10-12,i. 10-12.....	74
Figura 20 - Demonstração gráfica regressão linear entre a porcentagem total (%) das caseínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre algumas características do leite de cabra e do leite de vaca	29
Tabela 2 - Comparação das massas moleculares (KDa) das principais caseínas e proteínas do soro em análise referentes ao leite caprino e bovino, estimadas pelo método <i>lab-on-a-chip</i>	58
Tabela 3 - Comparação do peso molecular das principais proteínas do leite entre as técnicas SDS-PAGE e <i>lab-on-a-chip</i>	59
Tabela 4 - Regressão linear entre a porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.....	61
Tabela 5 - Regressão linear entre a área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.....	63
Tabela 6 - Média de porcentagem (%) de proteínas obtidas a partir de diferentes misturas de leite caprino/bovino.....	65
Tabela 7 - Comparação da massa molecular das principais proteínas do leite caprino e bovino pelo método SDS-PAGE.....	70
Tabela 8 - Regressão linear entre a porcentagem total (%) das caseínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CCS	Contagem de células somáticas
CN	Caseína
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PAGE	Gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance
SDS	Dodecil sulfato de sódio
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
CEJHB	Campo Experimental José Henrique Bruschi
SD	Solução de descoloração
DTT	Ditiotreitol
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
HCl	Ácido Clorídrico
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
mg	Miligrama
µL	Microlitro
v	Volts
mA	Miliamperes
pH	Potencial hidrogeniônico
kDa	Quilodalton
PM	Peso molecular
RF	Fator de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 A IMPORTÂNCIA DO LEITE NA ALIMENTAÇÃO	18
2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE	19
2.3 COMPOSIÇÃO DO LEITE	20
2.3.1 Gorduras	20
2.3.2 Proteínas do leite	22
2.3.2.1 Caseínas	22
2.3.2.2 Proteínas do soro	24
2.3.3 Lactose	25
2.4 LEITE DE VACA	25
2.5 LEITE DE CABRA	27
2.5.1 Composição e aspectos físico-químicos do leite de cabra	28
2.6 FRAUDE EM ALIMENTOS	30
2.6.1 Fraude no Leite	30
2.7 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE LEITE	32
2.7.1 Métodos para quantificação de proteínas totais	33
2.7.1.1 Método de Bradford	34
2.7.2 Método para separação de proteínas	35
2.7.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
2.7.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de ureia (UREIA-PAGE)	36
2.7.2.3 Eletroforese microfluídica <i>Lab-on-a-chip</i>	36
2.7.3 Métodos Moleculares	37
2.7.4 Detecção de misturas de leite de vaca e cabra	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41

4.1 AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO E BOVINO	41
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SIMULAÇÃO DE FRAUDE	41
4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS DE LEITE PELO MÉTODO DE BRADFORD	41
4.4 MÉTODO DE ELETROFORESE MICROFLUÍDICA <i>LAB-ON-A-CHIP</i>	42
4.4.1 Preparo das amostras	42
4.4.2 Eletroforese Microfluídica	43
4.4.2.1 Preparo do gel Dye Mix e Solução de Descoloração	43
4.4.2.2 Preparo da Solução de Desnaturação	44
4.4.2.3 Preparo das amostras e marcador de peso molecular (<i>Ladder</i>)	44
4.4.2.4. Aplicação das Amostras e Reagentes no Chip	45
4.4.2.5 Leitura do Chip no <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	46
4.5 MÉTODO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE UREIA (UREIA-PAGE) E DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)	47
4.5.1 Preparo das amostras para análise pelo método UREIA-PAGE	48
4.5.2 Preparo dos géis	48
4.5.2.1 Preparo do gel de separação	48
4.5.2.2 Preparo do gel de empilhamento	49
4.5.2.3 Aplicação das amostras e corrida eletroforética	49
4.5.2.4 Revelação dos géis	50
4.5.3 Preparo das amostras para análise pelo método SDS-PAGE	50
4.5.3.1 Preparo do gel de separação	51
4.5.3.2 Gel de Empilhamento	51
4.5.3.3 Aplicação das amostras e corrida eletroforética	51
4.5.3.4 Revelação dos géis	52
4.5.3.5 Análise das imagens	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD	53
5.2 SEPARAÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO LEITE CRU CAPRINO, LEITE CRU BOVINO E SUAS	

MISTURAS PELO MÉTODO <i>LAB-ON-A-CHIP</i>	54
5.2.1 Determinação Qualitativa	54
5.2.2 Determinação Quantitativa	61
5.3. COMPARAÇÃO DA SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS USANDO O MÉTODO TRADICIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E A TECNOLOGIA <i>LAB-ON-A-CHIP</i>	68
5.4 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PELO METODO EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) E EM PRESENÇA DE UREIA (UREIA-PAGE).	70
5.5 PERFIL ELETROFORETICO DAS PROTEINAS PELO MÉTODO EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE UREIA (UREIA-PAGE)	73
5.5.1 Determinação Qualitativa	73
5.5.2 Determinação Quantitativa	77
6 CONCLUSÃO	80
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERENCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos representa um importante papel na economia brasileira, sendo uma das mais tradicionais estruturas produtivas existentes no país (LOPES, SANTOS e CARVALHO, 2012). Dentre os diversos setores da indústria alimentícia, o de laticínios destaca-se entre um dos quatro com maior faturamento no Brasil. Neste sentido, a produção de leite está caminhando de sistemas menos produtivos para sistemas de produção com animais de maior produtividade e, obviamente, envolvendo processos tecnológicos mais sofisticados (CARVALHO, 2002).

A relevância do leite percebida como ganho na economia pode ser associado ao fato de que se trata de um alimento de grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo como fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas, fornecendo importantes nutrientes para uma vida saudável (SANTOS et al., 2011).

O leite produzido por diferentes espécies, como vacas e cabras, apresenta composições distintas apesar de ambos, consistirem, basicamente, em uma emulsão de gordura em solução aquosa, contendo vários elementos dissolvidos, como a lactose e minerais; e outros em forma coloidal, como os compostos nitrogenados (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001).

O leite de vaca destaca-se como o mais frequentemente consumido. De acordo com os dados do último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2011), a produção de leite bovino dobrou no país em 20 anos. Levando-se em consideração dados mundiais, o leite bovino equivale a 82,9% de todo o leite produzido e o leite de cabra, em terceiro lugar, corresponde a 2,3% desse montante (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012).

No entanto, em muitos casos, o leite de vaca precisa ser substituído na alimentação pelo leite de cabra, a fim de beneficiar indivíduos intolerantes e/ou alérgicos ao leite de origem bovina, sendo recomendado por orientação médica neste sentido. Os benefícios do leite de cabra incluem a maior digestibilidade e o baixo potencial alergênico em relação ao leite de vaca (HAENLEIN, 2004; PARK, 1994).

No entanto, uma prática fraudulenta consiste na adulteração do leite caprino com leite bovino. Dentre alguns fatores que contribuem para tal procedimento, estão

o menor rendimento na produção de leite de cabra, em conjunto com o preço mais baixo do leite de vaca. Portanto, a determinação da qualidade deste produto tem grande importância, tanto por razões econômicas, quanto de saúde pública. O controle deste tipo de adulteração exige a disponibilidade e padronização de métodos analíticos seguros que permitam vigilância constante pelos órgãos competentes (PESIC et al., 2011a).

Algumas técnicas permitem a identificação da mistura de leites de diferentes espécies, em especial a adição de leite de vaca ao de cabra. Dentre elas, estão métodos baseados na determinação da atividade enzimática (xantina-oxidase) e na identificação de diferenças entre as frações proteica e gordurosa, incluindo a presença de β -caroteno. No entanto, os métodos que consideram as diferenças nas frações proteicas parecem ser os mais confiáveis e envolvem diferentes processos analíticos, tais como os métodos imunológicos, eletroforéticos e cromatográficos (CENACHI, 2012).

Sabendo-se que o Brasil é o maior produtor de leite de cabra da América do Sul (IBGE, 2010) e devido à importância deste produto para o consumidor, o presente estudo objetivou avaliar as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de ureia (UREIA-PAGE) e eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip*, a fim de investigar e estabelecer técnicas rápidas e eficientes para detecção de fraude no leite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A IMPORTÂNCIA DO LEITE NA ALIMENTAÇÃO

O ser humano é o único mamífero que consome leite durante toda a sua vida. Logo após o nascimento, o leite materno constitui o primeiro alimento do bebê e é essencial para seu crescimento e desenvolvimento orgânico e funcional. Ao longo dos anos, o leite continua na dieta de grande parte dos indivíduos, ainda que em menores porções (ELWOOD et al., 2008).

Diante dos inúmeros benefícios do leite para a saúde, algumas estratégias visam incentivar o consumo deste produto e de seus derivados, (PEREIRA et al., 2009). Neste aspecto, ressalta-se, o fato deste alimento tratar-se de uma fonte rica em cálcio, mineral fundamental para boa formação dos ossos (BUZINARO, ALMEIDA e MAZETO, 2006). Para a maior parte dos indivíduos, a principal e mais conhecida fonte alimentar de cálcio é o leite e seus derivados. Nos Estados Unidos 72% do cálcio total ingerido provem destas fontes (GERRIOR e BENTE, 2004).

No Brasil, Muniz, Madruga e Araújo (2012) demonstraram por meio de um estudo de base populacional, que o consumo diário de leite e/ou derivados estava associado às características demográficas e socioeconômicas da população, sendo maior entre as mulheres e quase duas vezes maior entre os idosos, quando comparados aos mais jovens (20 a 29 anos de idade). Os autores explicam este fenômeno alimentar devido a indivíduos mais velhos terem formado seu hábito alimentar em um período no qual o consumo de alimentos processados e bebidas açucaradas eram menos frequentes.

Assim, sabe-se que a ingestão de quatro copos, o correspondente a 240 mL de leite, é o suficiente para atingir as recomendações nutricionais para indivíduos acima de 50 anos. Neste sentido, os produtos lácteos se destacam por apresentarem alta biodisponibilidade de cálcio relacionada com o conteúdo de vitamina D, também presente nestes alimentos e a presença de lactose que aumenta a sua absorção no intestino (BUENO e CZEPIELEWSKI, 2008; PEREIRA et al., 2009).

No entanto, apesar da importância deste alimento como fonte de diversos nutrientes, nem todos podem consumi-lo normalmente. Medeiros (2004) ressalta que indivíduos com o diagnóstico de intolerância a lactose necessitam de cuidado

especial para manterem a ingestão adequada de cálcio. Pessoas intolerantes à lactose do leite de vaca, também serão intolerantes ao leite de cabra. Nestes indivíduos, a lactose permanece no intestino sem ser digerida e é causa do aparecimento de vários sintomas, como a formação de gases, diarreia, náuseas e cólicas abdominais (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001).

Outro problema relacionado a indivíduos intolerantes a lactose consiste em carência de cálcio na alimentação. A hipótese de deficiência deste mineral relacionada ao baixo consumo de leite é reforçada pelos resultados de Medeiros (2004) que encontrou baixo nível de cálcio entre crianças que consumiam dieta isenta de leite de vaca e derivados.

Além disso, Bueno e Czepielewski (2008) explicam que, como o pH do leite é alcalino, o cálcio se mantém em suspensão pela formação de caseinato de cálcio, de citrato de cálcio e de um complexo com a lactose. Assim, a lactose, caseinato e citrato presentes no leite e derivados parecem explicar a melhor absorção de cálcio destas fontes se comparados a outros alimentos. Porém, além do cálcio, outros nutrientes presentes neste alimento também são de fundamental importância para a manutenção da saúde em diferentes fases da vida (PEREIRA et al., 2009).

A lactose desempenha importantes funções biológicas, entre as quais estimulação do crescimento das bifidobactérias e suplementação de galactose - um nutriente essencial à formação dos galactolipídeos cerebrais (MALDONADO et al., 1998).

Por fim, sabe-se que os benefícios gerados pelo consumo de leite e derivados se estendem ao passo que os estudos avançam. Indivíduos que se alimentam de leite regularmente apresentam menores riscos de desenvolverem doenças cardiovasculares, osteoporose e alguns tipos de neoplasias (TSUDA et al., 2000; PRENTICE, 2004; PARODI, 2007; ELWOOD e GIVENS, 2010; LAMPE, 2011; XU et al., 2013).

2.2 Características físico-químicas do leite

A densidade e a temperatura de congelamento do leite são duas propriedades físicas importantes na verificação de sua qualidade. A densidade relaciona-se à quantidade de sólidos totais diminuindo à medida que se adiciona água no leite e o

ponto de congelamento ou ponto crioscópico, por sua vez, permite descobrir a quantidade de água adicionada (BRASIL et al., 1999).

Sendo assim, a densidade do leite depende de dois fatores principais: teor de matéria seca e teor de matéria graxa, enquanto o ponto de congelamento do leite é uma de suas características menos variável, estando ligado à concentração dos componentes solúveis em água (FOOD SCIENCE, 2009). Ambos os parâmetros podem ser úteis para verificar a ocorrência de fraudes, como desnate prévio e adição de água (SANTOS et al., 2011).

Com relação ao ponto de congelamento, (Brasil et al. 1999) descrevem que a lactose e os sais contribuem por cerca de 75 a 80% da diminuição do ponto de congelamento total, sendo o restante influenciado por outros constituintes hidrossolúveis como cálcio, potássio, magnésio, lactatos, fosfatos, ureia, dióxido de carbono, entre outros.

Entre os fatores que podem alterar o ponto de congelamento do leite são citados: raça, período de lactação, estação do ano, alimentação, doenças inflamatórias (ex. mastite), ingestão de água pelo animal, leite ordenhado em diferentes períodos do dia, clima, concentrações altas de detergentes e desinfetantes, acidez e pH do leite (MENDES et al., 2010).

Outro aspecto útil, de acordo com Andrade et al. (2001) e que tem implicação nas características físico-químicas do leite é a contagem de células somáticas (CCS). Esta consiste em uma boa forma de acompanhar o estado sanitário do animal, além de indicar possíveis reduções na produção de leite. O termo células somáticas inclui diferentes elementos celulares normalmente presentes no leite, desde células de defesa do organismo a células epiteliais de descamação. Entre os fatores que podem provocar aumento na CCS, as mastites, sobretudo as bacterianas, são os mais importantes.

2.3 Composição do leite

2.3.1 Gorduras

A fração lipídica é considerada como aquela que apresenta a maior variabilidade dentre os constituintes do leite. A composição da mesma é

influenciada, em grande parte, pela dieta do animal, além de variar também entre ordenhas e entre animais distintos (FENNEMA et al., 2010).

A gordura do leite é composta essencialmente por glicerídeos e esteroides (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001). As gorduras contêm ácidos graxos essenciais ao organismo e atuam auxiliando na absorção das vitaminas lipossolúveis. O componente lipídico do leite é formado por uma complexa mistura, sendo os triglicerídeos, os lipídeos mais importantes (98%) (GONZALEZ e CAMPOS, 2003).

Alguns benefícios associados aos componentes lipídicos presentes no leite estão descritos no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 - Principais componentes graxos do leite e suas funções biológicas.

COMPONENTES	FUNÇÃO ATRIBUÍDA
Ácido Gama-amino-butírico	Anti-hipertensivo
Ácido Butírico	Eliminação de células cancerosas do cólon
Ácidos graxos ômega 3	Previnem enfermidades coronarianas e ataques cardíacos
	Desenvolvimento da retina e do cérebro; Prevenção de disfunções autoimunes; Prevenção de doença de Crohn
	Prevenção de câncer de mama, cólon e próstata
	Regulação da pressão arterial
	Prevenção de artrite reumatoide
Ácido Linolênico Conjugado	Inibição de câncer
	Inibição de aterosclerose
	Melhoramento do sistema imunológico; Antimutagênico
Esfingolipídios da membrana	Regulação do comportamento celular; Controle do câncer de cólon
	Redução das lipoproteínas de baixa densidade
	Aumento das lipoproteínas de alta densidade
Produtos metabólicos de triglicérides e fosfolipídios	Atividades antimicrobianas e antivirais
Ácidos graxos de cadeia curta e fosfolipídios	Prevenção contra enteropatógenos
	Efeito protetor contra úlceras gástricas; Defesa contra <i>Listeria</i>

Fonte: GOZÁLEZ, DURR e FONTANELLI, 2001.

Os lipídeos desempenham um papel importante na qualidade do leite e de outros alimentos porque contribuem com características importantes, como a textura, o sabor, o enriquecimento nutricional e a densidade calórica. A estabilidade física destes compostos se faz de grande importância para a qualidade do alimento, uma vez que muitos deles comportam-se como dispersões/emulsões, sendo termodinamicamente instáveis. Desta forma, para que se efetuem mudanças na composição de lipídeos o conhecimento de suas propriedades químicas e físicas é fundamental para a garantia de produção de alimentos de alta qualidade (FENNEMA, 2010).

2.3.2 Proteínas do leite

As proteínas do leite desempenham um papel tecnológico considerável na produção de produtos lácteos (SLAČANAC et al., 2004). As principais proteínas do leite, são as caseínas e as proteínas do soro. No entanto, Lourenço (2000) descreve ainda, a presença de proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, bem como enzimas e fatores de crescimento.

2.3.2.1 Caseínas

As caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfatos ligado à serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas, regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfifílico). Deste modo, são mais suscetíveis à proteólise e difundem-se mais rápida e fortemente em interfaces do que as proteínas do soro de leite (SWAISGOOD, 1982; WONG et al., 1996; BUNNER, 1977).

A separação por eletroforese da caseína total do leite bovino revela a presença de proteínas de migração rápida, fora da zona de migração da β -caseína, designadas caseínas α_S . Estas são agrupadas em duas famílias α_{S1} e α_{S2} . A α_{S1} é constituída por duas proteínas, caseínas α_{S0} e α_{S1} , cujas sequências de aminoácidos das estruturas primárias são idênticas. A caseína α_{S1} é a principal e, por isso, esse grupo é referido como α_S . A família α_{S2} tem cinco membros (α_{S2} , α_{S3} , α_{S4} , α_{S5} e α_{S6}), cujas mobilidades eletroforéticas se situam entre as caseínas α_{S1} e β (SGARBIERI; 2005).

As caseínas β representam entre 30 e 35% do total das caseínas. São sensíveis ao cálcio, formando suspensões coloidais ao invés de precipitarem como as caseínas α_{S1} e α_{S2} (MIKHEEVA et al., 2003). Sob temperaturas abaixo de 8°C ou em meios de pH elevado, ocorre a dissociação das caseínas β em monômeros. Já em temperaturas elevadas e pH próximo da neutralidade, ocorre a formação de polímeros em forma de contos (O'CONNELL; FOX, 2000).

De acordo com Sgarbieri (2005), a família das caseínas β é constituída de um membro principal com, no mínimo, sete variantes genéticas e oito pequenos fragmentos proteicos, formados por hidrólise enzimática do componente principal. A

diferenciação das variantes pode ser feita por eletroforese em gel de ureia ácida, de acordo com a mobilidade.

Corassin et al. (2013) explicam que a estrutura primária da caseína β é suscetível de hidrólise pela protease plasmina, uma enzima endógena do leite classificada como uma proteinase alcalina, produzindo fragmentos peptídicos referidos na literatura como caseínas γ , que permanecem nas micelas, além de pequenos fragmentos que se difundem para a fase líquida (soro), constituindo uma parte da fração proteose-peptona.

A caseína κ , em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas, atua como estabilizadora dessas partículas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao cálcio por ação dos sais de cálcio do leite. Para Fox e Brodkorb (2008), a κ -caseína pode estabilizar até 10 vezes o seu peso das caseínas cálcio-sensível (α_{s1} , α_{s2} e β) pela da formação de micelas, pois são solúveis na presença deste íon e corresponde a aproximadamente 12% da caseína total.

A solubilidade da caseína κ não é afetada pela presença do cálcio. A região da sequência primária da para- κ -caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as caseínas α_S e β dispostas no núcleo da micela, ao passo que o glicomacropéptido (GMP), em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase soro, interagindo com a água. Essas interações da sequência primária da caseína κ estabilizam as micelas no leite (SGARBIERI; 2005).

Todas as caseínas são sintetizadas na glândula mamária, enquanto algumas proteínas do soro (p.ex., imunoglobulinas, transferrina e soroalbumina) chegam ao leite procedentes do plasma. Proteínas do soro como a α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina também têm origem na glândula mamária) (ORDÓÑEZ et al., 2005).

De acordo com Egito et al. (2006), o perfil eletroforético em presença de ureia das caseínas do leite de cabra parece ser mais complexo que o de leite de vaca e de outras espécies, com diferenças sensíveis nas migrações eletroforéticas entre bandas (Figura 2). No caso do leite de vaca observa-se uma banda da caseína α_{s1} e uma banda da caseína β , enquanto no de outras espécies, várias bandas caracterizam cada uma das duas caseínas, como mostraram Visser et al. (1982) e Egito et al. (2006).

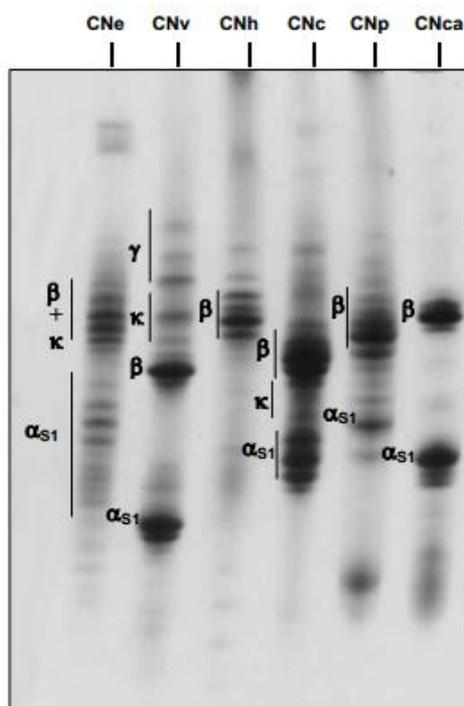


Figura 1 - Perfil eletroforético de migração das principais proteínas do leite de diferentes espécies. CNe-caseína de égua. CNv-caseína de vaca. CNh-caseína humana. CNc-caseína de cabra. CNp-caseína de porca. CNca- caseína de camela. Fonte: EGITO et al., 2006.

2.3.2.2 Proteínas do soro

As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas do leite e constituem-se por proteínas globulares, tais como a β -lactoglobulina (9,5% do nitrogênio total do leite), α -lactoalbumina (3,5%), imunoglobulinas (2%), soroalbumina - BSA (1%) e, também, proteosepeptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ et al., 2005).

A influência das proteínas do soro sobre as propriedades físico-químicas do leite é pequena, entretanto, possuem grande valor nutricional, devido ao alto teor de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), por serem fonte de aminoácidos essenciais, terem elevada digestibilidade, além de inúmeras aplicações industriais (SGARBIERI, 2005). De acordo com Farrel et al. (2004), a lactoferrina constitui uma outra família de soroproteínas específicas de ligação de ferro que ocorre no leite.

As soroproteínas não são fosforiladas, portanto, têm menor estabilidade térmica e solubilidade ao íon cálcio (CHEFTEL, 1989). Dentre elas, a α -lactoalbumina é uma metaloproteína que liga um átomo de cálcio por molécula, o

que lhe confere maior estabilidade térmica. Assim, as proteínas do soro podem ser classificadas, em ordem decrescente, da seguinte maneira: α -lactoalbumina > β -Lactoglobulina > soroalbumina bovina > imunoglobulinas (ORDÓÑEZ et al., 2005).

2.3.3 Lactose

A lactose constitui o principal carboidrato do leite, sendo a importante fonte de energia para o lactente. Presente no leite de diferentes mamíferos, a lactose pode alcançar até 10 % do teor total dos constituintes deste produto. Além disso, é considerada uma molécula prebiótica, pelo fato de favorecer o desenvolvimento de bífidobactérias e aumentar a absorção de cálcio e vitamina D (PERRONE, 2011).

2.4 Leite de vaca

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2008). Assim como em outros tipos de leite, os principais componentes do leite bovino são: água, proteínas, gorduras, lactose, vitaminas e sais minerais (DOLABELLA, 2012).

A água é o componente presente no leite em maior quantidade (87%), onde se encontram dissolvidos, suspensos ou emulsionados os demais componentes (FERNANDES e MARICATO, 2010).

Tendo em vista o perfil proteico, a proporção entre proteínas do soro e caseínas pode variar em função da raça, da alimentação fornecida e das condições ambientais (HARAGUCHI, ABREU e DE PAULA, 2006). Contudo, o leite de origem bovina contém, da mesma forma que os leites das demais espécies, a fração das caseínas mais abundante em relação às proteínas do soro (LACROIX et al., 2006).

As proteínas também consistem nos principais alérgenos encontrados no leite de vaca. Dentre elas, Ribeiro e Ribeiro (2001) citam a β -lactoglobulina - que não aparece no leite materno, a α -lactoalbumina e a albumina sérica. Destas, a β -lactoglobulina é citada por Del Valet et al. (1999) como a principal.

Já com relação às gorduras, o leite de vaca contém, em média, 35 g de gordura/litro, dos quais aproximadamente 98% são triglicerídeos e os 2% restantes são diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Destes últimos, predominam os saturados, que formam de 60 a 70% dos triglicerídeos, enquanto os insaturados correspondem de 25 a 30% do total. Os ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis pelo aroma característico do leite, são o butírico e o caproico. Com relação ao colesterol, sua quantidade no leite integral é, em média, 14 mg/100 mL (BRASIL, 2008; ARAÚJO, 2011). A gordura presente no leite forma glóbulos que ficam suspensos como em uma emulsão, cujos diâmetros variam de 1 a 10 microns. No leite de vaca, apenas 10% destes glóbulos têm tamanho inferior a 1,5 micron (LE JAOUEN, 1981).

A lactose é um dissacarídeo composto por glicose e galactose, porém não pode ser absorvida como tal, necessitando ser hidrolisada por ação da lactase intestinal. É responsável pelo seu sabor adocicado e corresponde em média a 50% dos sólidos desengordurados (MALDONADO et al., 2008).

Diversas vitaminas e minerais encontram-se neste alimento (PARK et al., 2007). Uma relação mais detalhada entre os principais nutrientes encontrados no leite de vaca e cabra pode ser vista no Quadro 2.

Quadro 2 – Quantidade de minerais e vitaminas presentes no leite bovino e caprino.

CONSTITUINTES PRESENTES EM 100 mL	LEITE BOVINO	LEITE CAPRINO
<i>Minerais</i>		
Cálcio (mg)	122	185
Fósforo (mg)	119	121
Potássio (mg)	152	181
Magnésio (mg)	12	16
Cloro (mg)	100	150
Sódio (mg)	58	41
Enxofre (mg)	32	28
<i>Vitaminas</i>		
A (UI)	126	185
Tiamina (mg)	0,045	0,068
Riboflavina (mg)	0,16	0,21
Ácido Pantotênico (mg)	0,32	0,31
Ácido fólico (µg)	5,0	1,0
Vitamina B ₁₂ (µg)	0,357	0,065
Vitamina B ₆ (mg)	0,042	0,046
Vitamina D (mg)	2,0	2,3
Vitamina C (mg)	0,94	1,29

Fonte: PARK et al., 2007 (Adaptado pelo autor).

2.5 Leite de cabra

A exploração dos caprinos para a produção de leite é narrada desde a mitologia grega, tendo sido Zeus alimentado com leite de cabra. A exploração dos caprinos para fornecimento de leite tem se expandido, pois, além de ser considerado um produto de alto valor nutritivo, os caprinos têm a capacidade de se adaptar às condições criatórias variáveis, facilitando a criação destes animais por famílias de baixa renda, e a população em geral, com uma melhoria do nível nutricional da dieta (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001).

Em torno de 74% do rebanho mundial de caprinos encontra-se difundidos nas regiões tropicais e áridas. No Brasil, cerca de 90% do rebanho caprino encontra-se na região Nordeste, principalmente na zona semiárida (DUBEUF et al, 2004).

Segundo Chapaval et al. (2006) e Mendes et al. (2007), a preferência do leite de cabra pelos consumidores é atribuída às suas características nutricionais e sua alta digestibilidade frente ao leite de vaca. Este fato pode ser parcialmente explicado devido a maior porcentagem (cerca de 28%) de glóbulos de gorduras com tamanho inferior a 1,5 microns presentes no leite de cabra (LE JAOUEN, 1981).

Ribeiro e Ribeiro (2001) completam esta assertiva de que a alta digestibilidade do leite de cabra se deve à grande dispersão e reduzido tamanho dos glóbulos graxos, e às características próprias de sua caseína, que, durante a digestão, forma coágulos menos resistentes e mais friáveis que os do leite de vaca, desintegrados mais rapidamente pelas enzimas proteolíticas.

No entanto, produtos lácteos fabricados a partir do leite de cabra, bem como o próprio leite, podem apresentar menor aceitação sensorial por indivíduos não habituados ao seu consumo (ALVES et al., 2008). Isso se deve ao sabor e ao odor característicos proporcionados pelo alto teor de ácidos graxos de cadeia curta (caproico, caprílico e cáprico) (DELACROIX-BUCHET e LAMBERET, 2000).

Morand-Fehr et al. (2000) estudaram as características do sabor do leite de cabra e verificaram que as mesmas podem ser atribuídas a presença de lipídios, particularmente sob a forma dos ácidos graxos de cadeia curta (caproico - C6:0, caprílico - C8:0 e cáprico - C10:0). Estes componentes estão em quantidade três vezes maior no leite de cabra do que no de vaca e suas cadeias, quando rompidas, ativam enzimas que liberam ácidos graxos voláteis de odores desagradáveis.

2.5.1 Composição e aspectos físico-químicos do leite de cabra

A composição e as características físico-químicas gerais do leite de cabra diferem do leite bovino e do humano, devido à sua alcalinidade, capacidade emulsificante e propriedades terapêuticas na medicina e nutrição humana (PARK et al., 2007). Vários fatores, contudo, podem interferir na quantidade dos constituintes, dos quais se destacam a raça do animal, o estágio de lactação, ciclo estral, cuidados dispensados e ao estado de saúde, a alimentação, as condições ambientais, as estações do ano, entre outros (JARDIM, 1984).

Este tipo de leite apresenta algumas características físicas que o distinguem do leite de vaca como sua acidez, ponto de congelamento e densidade (Tabela 1). A acidez do leite de cabra fresco, por exemplo, é ligeiramente inferior à do leite bovino, com 14° Dornic ou pH 6,4. No entanto, o leite termicamente tratado apresenta uma elevação no pH, podendo superar o do leite de vaca (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001; HAENLEIN e WENDORFF, 2006). Sobre o ponto de congelamento, Cunha (2007) descreve que o do leite de cabra é mais baixo que o leite de vaca, respectivamente $-0,583^{\circ}\text{C}$ e $-0,555^{\circ}\text{C}$.

Já a densidade varia entre 1,026 g/L a 1,042 g/L. Este valor ligeiramente superior ao do leite de vaca justifica a maior viscosidade do produto e é a razão por apresentar índice de refração e ponto de congelamentos inferiores (WENDORFF, 2006).

Outro aspecto a ser considerado é com relação à cor do leite de cabra. A coloração deste produto, que é branca pura, deve-se a ausência de caroteno (provitamina A), ao contrário do leite de vaca, cuja presença desta provitamina lhe confere aspecto mais amarelado (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001).

As exigências estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) quanto às características físico-químicas do leite de cabra estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Requisitos legais relacionados às características físico-químicas do leite de cabra.

REQUISITOS	LEITE INTEGRAL	LEITE SEMIDESNATADO	LEITE DESNATADO
Gordura, % (m/m)	Teor original	0,6 – 2,9	Máximo 0,5
Acidez, % ácido láctico		0,13 a 0,18	
Sólidos não-gordurosos, % (m/m)		Mínimo 8,20	
Densidade, g/L (a 15°C)		1,028 a 1,034	
Índice Crioscópico, °H		-0,550 a -0,585	
Proteína Total, % (m/m)		Mínimo 2,8	
Lactose, % (m/v)		Mínimo 4,3	
Cinzas, % (m/v)		Mínimo 0,70	

Fonte: BRASIL, 2000 e 2011.

De acordo com a Instrução Normativa Nº 62 de 2011, que estabelece o padrão de identidade e de qualidade do leite cru de vaca refrigerado, e de acordo com a Instrução Normativa Nº 37 de 2000 que estabelece o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, os leites de cabra e de vaca apresentam o mesmo intervalo de variação de densidade, variação de acidez semelhante, valores mínimos de gordura semelhantes, divergindo apenas quanto ao índice crioscópico (BRASIL, 2000; BRASIL 2011). Desta forma, pela análise dos parâmetros físico-químicos de ambos os tipos de leite, sugere-se grande similaridade entre eles, o que é questionado por alguns autores (HADJIPANAYIOTOU, 1995; CENACHI, 2012).

Quanto à presença de vitaminas e minerais no leite de cabra, um perfil mais detalhado pode ser visto no Quadro 2.

Tabela 1 – Comparação entre algumas características do leite de cabra e do leite de vaca.

CARACTERÍSTICAS	LEITE DE CABRA	LEITE DE VACA
Acidez (pH)	6,4	6,4 – 6,8
Ponto de congelamento	-0,583°C	-0,555°C
Densidade (g/mL)	1,026 - 1,042	1,023 e 1,040
Coloração	Branca	Branca amarelada
Odor	Característico de cabra	Suave

2.6 FRAUDE EM ALIMENTOS

A fraude nos alimentos é um termo coletivo que abrange a substituição deliberada, adição, adulteração ou falsificação de alimentos, ingredientes alimentares, ou embalagens de alimentos com declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto para ganho econômico. Neste contexto, uma das práticas que merece atenção da indústria de alimentos, do governo e das organizações de padronização é a fraude que conduz para o ganho econômico dos produtores de alimentos, fabricantes, processadores, distribuidores ou varejistas e que também pode afetar a saúde da população (MOORE; SPINK; LIPP, 2012).

A crescente preocupação com a fraude nos alimentos se deve pelo fato de a indústria alimentícia ser considerada como de grande impacto social devido à finalidade do bem produzido: a alimentação. Assim, o consumidor tem cada vez mais interesse sobre os processos que envolvem desde a procedência de matérias-primas até a distribuição de seus produtos, com o intuito de se adquirir alimentos mais seguros, com procedência e qualidade dos ingredientes garantidos e elaborados segundo as boas práticas de fabricação (RICHARDS, 2002).

De acordo com Duque (2008), tudo isso faz com que as empresas do setor de alimentos tenham de se adequar às exigências do consumidor final, uma vez que entender os desejos e necessidades dos consumidores é fundamental para compreender como as empresas devem trabalhar para atingir os seus propósitos.

Para Moore, Spink e Link (2012) a fraude nos alimentos envolve aspectos, sobretudo, financeiros. No entanto, Everstine, Spink e Kennedy (2013) ressaltam que algumas adulterações resultam em uma mudança de identidade e ou pureza do produto original pela substituição de um produto similar, diluição ou modificação do mesmo, podendo impactar no valor nutricional do alimento ou expor o consumidor a substâncias indevidas.

2.6.1 Fraude no Leite

Segundo o levantamento de fraudes em alimentos realizado por Moore, Spink e Link (2012), as fraudes alimentares mais frequentes ocorreram no azeite de oliva, no leite, no mel, em sucos de frutas (laranja e maçã) e no café. Neste caso, as

fraudes em leites e derivados só eram menores que aquelas no azeite (MOORE; SPINK; LINK, 2012) (Figura 1).

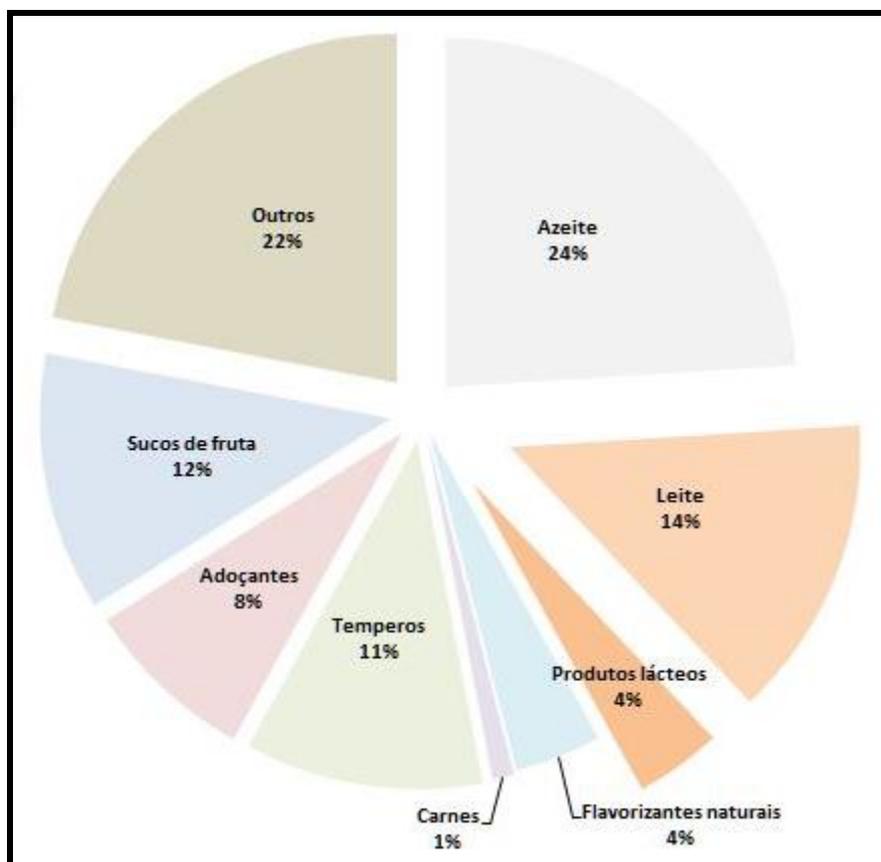


Figura 2 - Principais alimentos alvos de fraudes. Fonte: MOORE; SPINK; LINK, 2012 (Adaptado pelo autor).

As oscilações sazonais e a menor produção do leite caprino, em conjunto com o preço mais baixo do leite bovino são os principais motivos para esta adulteração. Assim determinar a qualidade do leite caprino tem grande importância, por razões econômicas e de saúde pública, uma vez que o leite de cabra é uma alternativa para a utilização por lactantes, crianças e idosos que apresentam problemas de digestibilidade e alergia frente ao leite de vaca (PESIC et al., 2011).

Assim, a necessidade nacional de grandes volumes de leite de boa qualidade faz com que a pecuária leiteira se torne um nicho altamente competitivo. Com o propósito de oferecer produtos lácteos de alta qualidade, impele-se a progressiva adaptação deste importante segmento as exigências do mercado consumidor. Uma das estratégias para estimular e assegurar a qualidade da matéria-prima, em

diversos países é o pagamento diferenciado para produtores que forneçam leite com teores mais elevados de gordura e proteína, além de outros parâmetros de qualidade considerados essenciais (OLIVEIRA, 2011).

Portanto, a busca de métodos eficientes que atendam a demanda dos produtos de origem animal de qualidade torna-se cada vez mais importante, ao passo que a produção e processamento de alimentos mais elaborados e com certificação de qualidade garantida avança rapidamente (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008; CHAPAVAL et al., 2006).

2.7 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE LEITE

Algumas técnicas usadas no controle de qualidade do leite, inclusive no leite de cabra, consistem na separação e quantificação das proteínas, sendo de suma importância na pesquisa de laticínios. Em alguns casos, a identificação e a nomenclatura destas proteínas são baseadas em sua separação por técnicas eletroforéticas (ANEMA, 2009 e EGITO et al., 2006).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) destaca-se como uma importante técnica para análise do leite e seus derivados. Esta técnica pode ser realizada em meio alcalino, usando agentes redutores ou em meio isoelétrico (PATEL et al., 2007).

Outra técnica importante é a de PCR que permite localizar um pequeno fragmento de DNA numa complexa mistura de moléculas mais ou menos fragmentadas e replicá-lo milhões de vezes, permitindo a sua posterior identificação (FAIRCHILD, LEE e MAURER, 2006). Deste modo, é possível identificar as espécies componentes dos diferentes produtos alimentares. No caso especial da fraude do leite de cabra com leite de vaca, permite a identificação deste último em produtos onde deveria apenas haver o leite de cabra (EGITO et al., 2006).

Cromatografia líquida de alta performance (CLAE), eletroforese capilar e ensaios imunológicos também são técnicas usadas com sucesso para separação e quantificação de proteínas do leite, do soro. Em geral, boas correlações têm sido observadas quando estes vários métodos são comparados. Cabe ressaltar que cada método têm suas vantagens e desvantagens e não existe uma técnica que

empregada sozinha possa fornecer todas as informações sobre as proteínas do leite (ANEMA, 2009; PATEL et al., 2007).

No entanto, Anema (2009) alerta para uma das desvantagens de boa parte das técnicas de separação: o tempo requerido para preparação das amostras, realização da separação das proteínas e integração final e quantificação de componentes proteicos individuais presentes na amostra. Além disso, muitas destas técnicas exigem grandes volumes de tampões e solventes que podem ser caros e tóxicos.

Enfim, na prática, as proteínas totais lácteas são, com frequência, determinadas por espectrofotometria por radiação infravermelha, enquanto que, as frações proteicas podem ser determinadas por meio de diferentes técnicas eletroforéticas que permite estabelecer as diferentes frações proteicas (FONSECA; SANTOS, 2000; FARREL JR. et al., 2004).

2.7.1 Métodos para quantificação de proteínas totais

O desenvolvimento de metodologias e estudos comparativos de técnicas espectrofotométricas para a determinação de proteínas totais sempre foi de grande interesse e utilidade para profissionais de diferentes áreas, desde a indústria de alimentos, até laboratórios de análises clínicas, entre outros (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

As proteínas do leite são muito valorizadas pelas suas excelentes propriedades nutritivas, cuja composição em aminoácidos atende à maioria das exigências fisiológicas do ser humano; e também propriedades tecnológicas e funcionais. Estas últimas derivam de suas características físico-químicas resultando propriedades funcionais de grande interesse tecnológico como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade de espuma, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (MODLER, 2000; WONG et al., 1996).

Dentre os métodos para quantificação de proteínas totais, Zaia, Zaia e Lichtig (1998) destacam como os mais utilizados o do biureto, o de Lowry, o de Bradford, o de Smith e o de absorção de proteínas no ultravioleta.

2.7.1.1 Método de Bradford

O método de Bradford é uma técnica usada para a quantificação de proteínas totais de uma amostra e surgiu com as vantagens de eliminar a maioria dos problemas envolvidos com outros procedimentos para a mesma finalidade, de ser facilmente utilizado para processar grandes números de amostras, bem como ser adaptável a automação (BRADFORD, 1976).

Este método é baseado na interação entre o corante *Coomassie Brilliant Blue* BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 (vermelho) provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

O complexo proteína-corante é bastante específico sendo útil para mensurar a quantidade de proteína na amostra. A ligação do corante às proteínas é um processo muito rápido (aproximadamente 2 minutos) e o complexo proteína-corante permanece disperso em solução por um tempo relativamente longo (aproximadamente 1 hora), tornando assim o processo muito rápido e não exigindo tempo crítico para o ensaio (BRADFORD; 1976).

Existem poucas substâncias que são interferentes no método de Bradford. Estes interferentes normalmente reagem com as proteínas impedindo a reação com o corante BG-250 ou reagem com o corante, complexo este que apresenta maior absorbância. Os métodos de eliminação destes interferentes variam conforme o caso. Contudo, um método eficaz consiste na precipitação das proteínas com ácido tricloroacético. O Quadro 4 mostra os interferentes mais comuns ao método de Bradford (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Quadro 4 – Principais interferentes no método de Bradford.

INTERFERENTES	INTERFERÊNCIA
Ureia	Fornece resultado falso positivo, acima de 45 g/L.
Cloreto de Sódio	Fornece resultado falso negativo, acima de 1 M
Cloreto de Potássio	Fornece resultado falso negativo, acima de 1 M
Detergentes (Tween-20 entre outros)	A larga banda de absorção em 650 nm, devido a reação entre o corante e os detergentes, interfere na banda em 595 nm, resultando em falso positivo.
Polifenóis e polifenóis oxidases	Reagem com as proteínas impedindo a formação do complexo das mesmas com o corante BG-250.
Glicerol	Provoca falso positivo.
Lipídeos	Causam turbidez na amostra
Fluoreto	Diminui a absorção da amostra.

Fonte: ZAIA; ZAIA; LICHTIG (1998) (Adaptado pelo autor).

2.7.2 Método para separação de proteínas

A composição proteica do leite pode ser determinada por diferentes técnicas, dentre elas a eletroforese, que constitui uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo. Baseada na migração de moléculas ionizadas na mesma direção, que se repelem mutuamente mantendo sua estrutura e propriedades intactas, a eletroforese possibilita a separação das mesmas em várias frações (BRAMMER, 2001).

2.7.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese é uma técnica que permite a separação de diferentes tipos de proteínas em um suporte que, normalmente, pode ser acetato de celulose, gel de agarose ou em gel de poliacrilamida (SGARBIERI; 1996; GONZÁLEZ, 2003). Para Sgarbieri (1996), a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS). Por este motivo, tal técnica é também conhecida como SDS-PAGE.

Kamoun et al. (2006) exemplificam que a determinação das frações proteicas por eletroforese pode ser realizada com leite total desnatado ou, ainda, a técnica pode ser usada para purificar as proteínas, ou seja, extraí-la a partir de uma mistura

complexa. Entretanto, para esta última aplicação, é fundamental conhecer a quantidade da proteína pesquisada em relação às outras proteínas e dispor de um método que permita dosar todas as proteínas do meio.

A eletroforese em poliacrilamida atua por dois princípios: exclusão molecular, devido à porosidade característica do gel e migração no campo elétrico devido à diferença na densidade de cargas de cada proteína. Em meio alcalino, grande parte das proteínas apresentam cargas negativas e, quando aplicado um campo elétrico, ocorre a migração das mesmas para o polo positivo em diferentes velocidades, dependendo também de suas propriedades físicas, densidade de cargas, tamanho e forma molecular, de modo que torna-se possível a separação da amostra em diferentes frações proteicas (SGARBIERI, 1996; GONZÁLEZ, 2003).

2.7.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de ureia (UREIA-PAGE)

Egito et al. (2006) descrevem a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida na presença de ureia, técnica também designada como UREIA-PAGE, como um método eficiente para identificação de adulteração do leite de cabra com leite de vaca. Neste estudo, os autores ainda propuseram uma modificação do método referente à preparação e à separação das caseínas, bem como coloração rápida com aquecimento do gel, possibilitando a obtenção de resultado rápido e seguro.

Entre as técnicas eletroforéticas, a UREIA-PAGE destaca-se por apresentar melhor mobilidade eletroforética das frações proteicas. A vantagem do método, comparado com outros métodos de gel de poliacrilamida, é a nitidez da identificação da α_{s1} -caseína bovina com migração mais rápida no leite bovino do que a α_{s1} -caseína do leite caprino. Isso porque cada espécie possui um perfil de UREIA-PAGE característico, como uma impressão digital (EGITO et al., 2006).

2.7.2.3 Eletroforese microfluídica Lab-on-a-chip

Uma das técnicas mais recentes desenvolvida para a separação e quantificação de proteínas, bem como de DNA e RNA, denomina-se eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* (WU, QIN e LIN, 2008).

Para proteínas, o método microfluídico tem sido relatado como uma excelente alternativa ao método tradicional SDS-PAGE. Em adição, tal técnica utiliza pouca quantidade de amostras e reagentes (0,5 mL/chip). Desta forma, gera pouca quantidade de produtos químicos tóxicos que precisam ser descartados por trabalhar com volumes mínimos de todos os reagentes. Além disso, é muito útil nos casos onde as amostras são extremamente caras ou escarças (ANEMA, 2009).

Os tempos de migração são padronizados com a massa molecular de marcadores estabelecidos como padrões internos, e as massas moleculares calculadas a partir de uma curva padrão criada a partir da variação das massas moleculares. No mais, a técnica microfluídica utilizando o *chip* é uma versão em miniatura de SDS-PAGE e, como tal, todos os passos envolvidos na eletroforese convencional (preparação do gel, carregamento da amostra, separação, coloração, descoloração e detecção) são executados dentro do dispositivo, em cerca de 60 minutos. Além disso, a técnica permite a separação e quantificação de proteínas, sob condições desnaturantes (como o SDS) na ausência ou na presença de agentes redutores (WU, QIN e LIN, 2008; ANEMA, 2009).

Por fim, estudos demonstraram a utilidade deste método na análise de proteínas do leite e derivados, bem como para investigar adulterações por adição de leite proveniente de diferentes espécies (WU, QIN e LIN, 2008; ANEMA, 2009).

2.7.3 Métodos Moleculares

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e a aplicação das técnicas de marcação molecular induziram transformações consideráveis em diversos ramos da Ciência (RAFALSKI, 2002). Além disso cada uma destas técnicas têm seus domínios de aplicação, princípios e custos bem caracterizados (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Os métodos moleculares, também designados de métodos de marcação podem ser reunidos em duas grandes categorias: os marcadores do tipo análise de restrição de fragmentos polimórficos ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, em inglês) e os marcadores baseados no método de PCR (CARRER, BARBOSA E RAMIRO; 2010).

A RFLP, de acordo com Griffiths et al. (1999) é uma técnica da primeira geração de marcadores, baseia-se na variabilidade presente em sequências de nucleotídeos do DNA genômico após digestão por enzimas de restrição. Após a digestão do DNA, um grande número de fragmentos com tamanhos variados é gerado e, em seguida, são hibridizados a uma sonda de DNA para a identificação de fragmentos homólogos. Mutações nos locais de restrição e/ou deleções/inserções de um fragmento de DNA na região reconhecida pela sonda são responsáveis pelo polimorfismo detectado (CARRER, BARBOSA E RAMIRO; 2010).

No método do PCR, quando dois *primers* se ligam em distâncias que variam entre 200 e 2000 pb um do outro, em fitas opostas do DNA, a região delimitada entre ambos é amplificada. O polimorfismo detectado se deve a mutações tanto nas regiões amplificadas, como nos locais de fixação dos *primers*. Os principais marcadores são baseados nas técnicas *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e em microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR) (CARRER, BARBOSA E RAMIRO, 2010).

A técnica RAPD consiste na amplificação ao acaso de fragmentos de DNA onde a utilização de um único *primer* curto (10 pb) permite que o polimorfismo seja representado pela amplificação de diversos pontos do genoma de *primers* não específicos (WILLIAMS et al., 2001).

A AFLP é a análise conjunta da presença de polimorfismo nos locais de restrição enzimática e na hibridização utiliza, simultaneamente, enzimas de restrição para clivagem do DNA e amplificação por PCR dos fragmentos obtidos na digestão. É a combinação enzima de restrição e *primers* que permite a identificação de polimorfismo entre indivíduos (MUELLER e WOLFENBARGER, 1999).

Os marcadores microssatélites ou SSR são descritos por Hayden et al. (2008) como aqueles constituídos de sequências repetidas em arranjos lineares de 1 a 6 nucleotídeos, encontradas dispersas em todo o genoma. O autor explica que a análise da variação entre indivíduos é realizada por meio de amplificação em PCR, utilizando *primers* específicos construídos nas regiões que flanqueiam os microssatélites. É o par de *primers* (senso e antissenso) do microssatélite que constitui o marcador.

Outras técnicas de marcação molecular estão sendo desenvolvidas e utilizadas, porém ainda em menor escala quando comparadas a RAPD, AFLP e SSR e suas variáveis. Todas essas técnicas são baseadas na aplicação em géis e, de

uma maneira geral, são trabalhosas e de custo elevado (CARRER, BARBOSA E RAMIRO; 2010).

Complementarmente, Malorny et al. (2003) concluíram que a introdução do PCR em pesquisas laboratoriais tem sido considerada uma alternativa para os métodos tradicionais. Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são as maiores vantagens deste método. Entretanto, algumas como o custo do alto investimento tecnológico, a necessidade de aprovação oficial e regulamentos e instruções padronizadas ainda impedem seu amplo uso.

2.7.4 Detecção de misturas de leite de vaca e cabra

Segundo Veloso et al. (2002a), com o objetivo de garantir a genuinidade dos produtos à base do leite de cabra, alguns marcadores de autenticidade químicos e biológicos, tem sido utilizados a partir de diferentes metodologias analíticas. No entanto, devido à grande variedade de produtos com características microbiológicas e bioquímicas distintas e, ainda, devido aos diferentes fatores que podem afetar os processos pelos quais o leite e seus derivados passam antes do consumo, os resultados obtidos podem não ser aplicados para diferentes tipos de alimentos.

Para Ramos (1984), as metodologias analíticas para análise do leite e derivados pode ser dividida em dois grupos: um baseado na determinação da composição em gordura, e outro na composição em proteínas do leite. Grande parte dos métodos baseados na composição de proteínas do leite utilizam métodos cromatográficos, técnicas imunológicas, reação da polimerase em cadeia, e técnicas eletroforéticas. No entanto, neste campo os métodos eletroforéticos e imunológicos têm-se mostrado mais vantajosos e adequadas para avaliar a qualidade e autenticidade dos produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas (VELOSO et al., 2002a; EGITO et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil eletroforético das proteínas do leite caprino e do leite bovino e suas misturas pela metodologia de eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* e confrontar os resultados com a metodologia convencional de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de ureia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar fraude no leite de cabra por adição do leite de vaca pelo perfil das proteínas usando eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip*;
- Detectar a fraude no leite de cabra por adição do leite de vaca pelo perfil das proteínas usando o método UREIA-PAGE;
- Comparar os métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida citados anteriormente com a eletroforese *lab-on-a-chip*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO E BOVINO

As amostras de leite de cabra fresco da raça Saanen foram provenientes da Laiteria Cabriola no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, enquanto as de leite de vaca da raça Holandesa foram obtidas no Sistema de Gado Puro do Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco (MG). As mesmas foram coletadas nos meses de agosto de 2012 e fevereiro de 2013.

As amostras foram transportadas em frascos plásticos acondicionadas em caixas térmicas com gelo, sendo posteriormente armazenadas a -80°C até o momento das análises. As determinações analíticas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora (MG).

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SIMULAÇÃO DE FRAUDE

As amostras foram descongeladas lentamente em banho de gelo, em seguida as amostras foram preparadas nas seguintes proporções crescentes de leite de vaca em relação ao de cabra: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 35, 50, 100% (v/v). Sendo o leite de cabra puro (0%) e leite de vaca puro (100%).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS DE LEITE PELO MÉTODO DE BRADFORD

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford utilizando o *kit* Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA, EUA). A leitura das absorbâncias foi

realizada em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000) no módulo “Protein Bradford”.

Para obtenção de uma curva de calibração foi utilizado, como proteína padrão, a albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluída em água ultrapura. As concentrações de BSA utilizadas foram: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL. Para o preparo destas soluções pipetou-se 4 µL de cada uma das concentrações da proteína padrão em microtubos e adicionou-se 200 µL do reagente Bradford diluído em água ultrapura (1:5 v/v).

Em seguida, os padrões foram homogeneizados em um agitador de tubos tipo *vórtex* e procedeu-se às medidas de absorbâncias. Como “branco” foi usado o reagente de Bradford puro.

As amostras contendo diferentes proporções de leite de cabra e de vaca foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:25 (v/v). Posteriormente foram misturadas com o reagente Bradford, sendo 4 µL de amostra e 200 µL do reagente (1:50 v/v) e então, submetidas à leitura no espectrofotômetro. Foi construída uma curva de calibração pelo método de regressão linear utilizando o programa Excel a partir da medida de absorbância de crescentes concentrações da proteína padrão para posterior análise do coeficiente de correlação (R^2).

4.4 MÉTODO DE ELETROFORESE MICROFLUÍDICA *LAB-ON-A-CHIP*

As amostras de leite utilizadas nesta análise foram as mesmas descritas anteriormente no item 4.2 Preparo das amostras.

No entanto, outra amostra contendo uma mistura das proteínas padrões de leite bovino (α_{s1} -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi preparada na concentração de 1 mg/mL para cada padrão, a qual foi denominada “mix de proteína”.

4.4.1 Preparo das amostras

As amostras de simulações de fraudes foram diluídas no tampão para separação de proteína (SEP) preparado com ureia (6M), citrato de sódio (20mM),

ácido cítrico (0,1M), 0,05% de hidroximetilpropilcelulosa, em pH igual a 3, na proporção 1:25, a fim de que a concentração final das amostras analisadas fosse igual a 3.000 ng/ μ L, ajustando-as, deste modo, à faixa qualitativa do método *lab-on-a-chip* (6 a 4.000 ng/ μ L) indicada pelo fabricante. O “mix” de proteínas também foi diluído em água ultrapura.

4.4.2 Eletroforese Microfluídica

Para separação das proteínas e identificação dos níveis de fraude foi utilizado o método de eletroforese microfluídica em chip do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) associado aos reagentes do kit Protein 80 (Agilent Technologies), conforme protocolo para execução dos procedimentos fornecido pelo fabricante.

Os reagentes que compunham o kit consistiam em uma solução de gel matriz, um marcador de peso molecular de proteína de 5 a 80 kDa (*Ladder*), uma solução desnaturante de proteína, solução de descoloração, chip específico para análise de proteína, tubos coletores com coluna/filtro. A preparação dos reagentes e do chip foi feita conforme procedimento do método *lab-on-a-chip* fornecido pelo fabricante.

Antes de iniciar os procedimentos todos os componentes do kit e amostras foram deixados à temperatura ambiente por 30 minutos.

4.4.2.1 Preparo do gel Dye Mix e Solução de Descoloração

A solução de *Protein 80 dye concentrate* foi misturada em vórtex por 10 seg. e centrifugada pelo mesmo tempo em minicentrífuga. Desta solução, 650 μ L foram transferidos para um outro microtubo com filtro descartável (fornecido pelo kit) e então centrifugados a 2500 x g por 15 minutos.

Posteriormente, 25 μ L da solução *Protein 80 dye concentrate* foram adicionados no tubo contendo *Protein 80 gel matrix* e misturada em um agitador de tubos. A solução foi homogeneizada por 10 segundos no vórtex e centrifugada por 15 segundos. O *gel matrix* e o *gel dye concentration* forma uma mistura homogênea cuja validade é de quatro semanas e rendimento suficiente para utilizar em nove

chips. O *gel dye concentration* foi armazenado protegido da luz até o momento de preparo do chip.

A solução de descoloração (SD) foi preparada transferindo 650 μL de *Protein 80 gel matrix* para um novo microtubo coletor com filtro, o qual foi centrifugado em 2500 x g por 15 minutos. Descartado a coluna. O tubo coletor contendo a SD foi armazenado a 4°C o momento de preparo do chip. Esta solução é suficiente para 25 chips e tem validade de quatro meses.

4.4.2.2 Preparo da Solução de Desnaturação

A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada sob condições redutoras utilizando solução de Ditioneitol (DTT). Para evitar seu descongelamento/congelamento, a solução *Protein 80 sample buffer* foi dividida e armazenada a -20°C. Essa solução foi aliqüotada em 40 μL e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução tampão foi homogeneizada por 10 segundos em agitador de tubos e centrifugada por 15 segundos em minicentrífuga. A seguir, foram adicionados 1,4 μL de DTT aos 40 μL da *Protein 80 sample buffer*, homogeneizada por 5 segundos em agitador de tubos e centrifugada por 15 segundos em minicentrífuga.

Após o preparo, a solução foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

4.4.2.3 Preparo das amostras e marcador de peso molecular (*Ladder*)

Em cada 4 μL (0,018 mg/mL) de amostra foram adicionados 2 μL de solução desnaturante, seguindo-se a homogeneização e centrifugação das mesmas em minicentrífuga por 15 segundos.

Para um segundo microtubo foram transferidos 6 μL do *Ladder*. As amostras e o *Ladder* foram desnaturados por 5 minutos a 95°C e depois colocadas em banho de gelo por 10 segundos. Em seguida, foram centrifugados em minicentrífuga por 15 segundos.

Seguindo-se o protocolo do fabricante, foram adicionados 84 μL de água ultrapura aos tubos com as amostras e com o *Ladder* e então, procedida a homogeneização dos mesmos em agitador de tubos.

4.4.2.4. Aplicação das Amostras e Reagentes no Chip

A aplicação das amostras e reagentes no chip foi orientada pelo esquema demonstrado na Figura 3, com a indicação dos poços para a distribuição dos reagentes e das amostras.

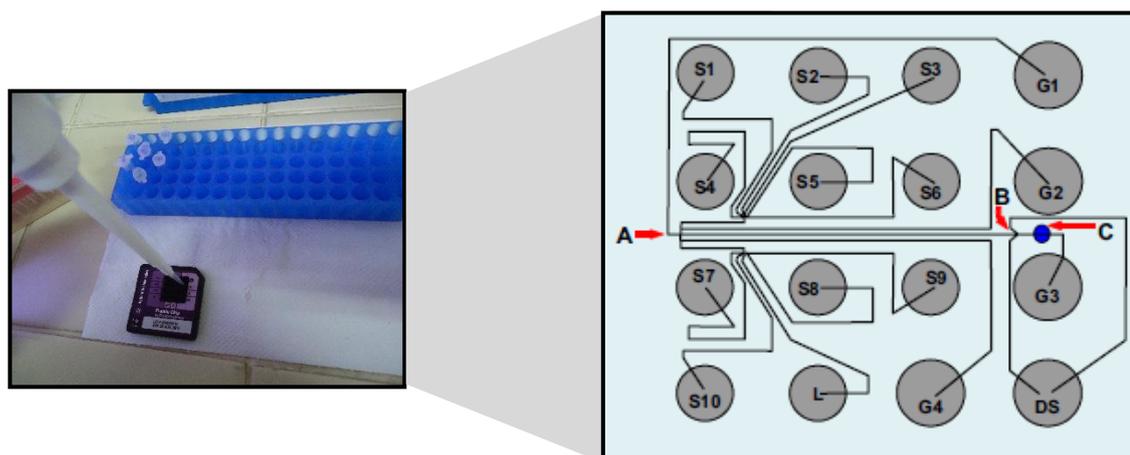


Figura 3 - Representação dos poços e canais de um *chip lab-on-a-chip* do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer para análise de proteínas. G1 a G4 - gel / corante matriz; DS - solução de descoloração; S1 a S10 amostras de leite; L- *Ladder*. As setas indicam: (A) - canal de separação, (B) - posição de descoloração e (C) - posição da janela de detecção. FONTE: ANEMA (2009). (Adaptado pelo autor).

Nos poços identificados como G1, G2, G3 e G4 foram aplicados 12 μ L de *Gel-Dye mix*. O poço G1 foi utilizado para aplicação de pressão de ar fornecido pelo equipamento (*Chip Priming Station*) por uma seringa que auxiliou na distribuição do *Gel-Dye mix* pelos canais dentro do chip. Além disso, 12 μ L de solução descolorante foram aplicados no poço DS. Nos poços S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 e S10, foram aplicados 6 μ L de cada uma das amostras. O poço L foi utilizado para o padrão de peso molecular, adicionando-se 6 μ L da solução de *Ladder*. Todo o procedimento está demonstrado na Figura 4.

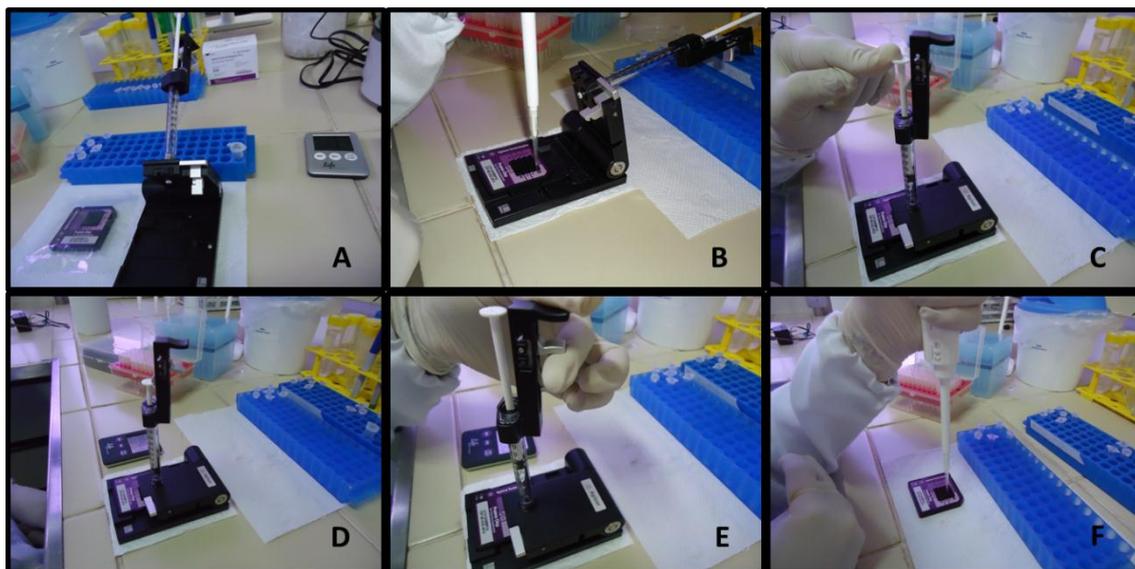


Figura 4 - Aplicação das amostras no chip do equipamento Chip Priming Station. **A** – Microchip e *Chip Priming Station*; **B** – Aplicação de 12 μL do *Gel-Dye*; **C** – Pressão do embolo da seringa para baixo na alavanca; **D** – Repouso por 60 segundos e, em seguida, liberação da alavanca. O embolo movimenta-se até a marca de 0,3 mL; **E** – Após 5 segundos, o embolo é levado lentamente até a posição de 1 mL, removido o excesso e aplicação de gel nos outros poços; **F**- Aplicação das amostras nos poços do microchip.

Todas as amostras foram aplicadas em triplicata nos *chips* com três repetições de cada *chip* seguindo o delineamento estatístico em bloco incompleto e desbalanceado.

4 4.2.5 Leitura do Chip no Agilent 2100 Bioanalyzer

O chip foi colocado no aparelho (*Agilent 2100 Bioanalyzer*) (Figura 5) em um cartucho específico para proteína. Com o fechamento da tampa, houve o correto encaixe dos eletrodos aos poços do chip.



Figura 5 - Equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer.

Utilizando-se o programa *2100 Expert Software*, as amostras foram identificadas e o início da eletroforese foi acionado. A corrida eletroforética e a leitura das informações duraram cerca de 30 minutos.

A migração das proteínas no gel foi observada pela da área dos picos e peso molecular disponíveis com imagem do gel e eletroferograma produzidos pela fluorescência das proteínas e do marcador de peso molecular. Assim, os picos obtidos na eletroforese foram produzidos pelo software. Após a corrida, o chip foi retirado do equipamento e descartado. Os eletrodos foram higienizados com chip de limpeza próprio do sistema.

4.5 MÉTODO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE UREIA (UREIA-PAGE) E DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizado em condições redutoras com dodecil sulfato de sódio (SDS) e ureia (UREIA-PAGE) pelo sistema de eletroforese vertical (mod. Z352802-1EA *Sigma-Aldrich* St. Louis, MO, USA), conforme descrito por Pereira (2003), e Egito (2006) com modificações.

A sequência de análise após o preparo das amostras envolveu as seguintes etapas: preparo dos géis, aplicação das amostras, corrida, revelação, conservação, fotodocumentação e análise em gel (*Image Quant TL V2005* da *Amersham Biosciences-Buckinghamshire, England*).

Todas as amostras foram aplicadas em triplicata nos géis com três repetições de cada gel seguindo o delineamento estatístico em bloco incompleto e desbalanceado.

4.5.1 Preparo das amostras para análise pelo método UREIA-PAGE

O preparo das amostras para análise consistiu em dissolução da amostra em solução tampão, na proporção de 15 μ L (0,135 mg/mL) para 500 μ L (1:34), respectivamente. Para o preparo do tampão, utilizou-se TRIS (6,2 mM), ureia (0,82 M), HCl (12,6 mM), b-mercaptoetanol (0,024 M), azul de bromofenol (2,24 mM). O pH foi ajustado para 9,0 em seguida, aqueceu-se a 40°C em banho-maria por 1 hora. A seguir, o tampão foi centrifugado a 10.000 X g em temperatura de 5°C por 10 minutos, Após preparadas as amostras foram aplicadas no gel imediatamente. Utilizou-se como padrão o leite de cabra puro 0% e o leite de vaca puro 100 %.

4.5.2 Preparo dos géis

Para preparo dos géis, placas de vidro foram montadas conforme instruções do fabricante, formando sanduíches, separadas por espaçadores, fixadas com prendedores e encaixadas no suporte de uma cuba de modo a evitar vazamentos do tampão do eletrodo no momento da corrida. Cada um dos géis utilizados foi preparado isoladamente.

4.5.2.1 Preparo do gel de separação

O gel de separação foi preparado na concentração de 10% (m/v) a partir da solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (0,56 M/0,013 M) em tampão de TRIS/Ureia/HCl (0,26 M/ 3,2 M/ 0,9 M) diluído em 100 mL de água destilada, em pH 8,9. A polimerização do gel foi feita com a adição 30 mL de tetrametiletilenidiamina (TEMED) e 300 mL de persulfato de amônia (0,1g/mL), adicionado no momento da preparo.

A seguir, a solução foi vertida no interior de uma placa, lentamente, até um altura 2 ou 3 cm da extremidade superior da mesma. Na sequência, adicionou-se

butanol, com auxílio de uma pipeta, pelas extremidades das placas até total cobertura da superfície do gel para eliminação de bolhas e nivelamento do gel. Ao fim deste processo, aguardou-se cerca de 30 minutos até a completa polimerização do gel e o butanol foi retirado com o uso de papel filtro secando-se a superfície do gel.

4.5.2.2 Preparo do gel de empilhamento

O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 6% (m/v) a partir da solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (0,56 M/0,01 M) em tampão de Tris/Ureia/HCl (0,03 M/2,5M/0,7M) diluído em 100 mL de água destilada, em pH 7,6.

Os catalizadores foram adicionados na concentração de 10 mL de TEMED e 60 mL de persulfato de amônia (0,1g/mL) colocado no momento do preparo. A solução foi vertida até a extremidade superior da placa. O pente que forma os poços para a aplicação das amostras foi inserido. Procedeu-se à preparação de um gel de cada vez. Aguardou-se cerca de 30 minutos até a completa polimerização do gel. O tampão do eletrodo foi diluído na proporção de cinco vezes.

4.5.2.3 Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Os pentes foram retirados e os poços formados guarnecidos com solução tampão de corrida preparado com Tris/Glicina (0,12 M/ 0,97 M) diluído em 1000 mL de água purificada (solução estoque). Esta solução foi diluída 5 vezes no momento de uso, utilizando o sistema tampão descontínuo descrito por Laemmli (1970), com modificações, conforme descrito a seguir.

Foram injetados 30 μ L de amostra por poço. A montagem da cuba inferior foi completada, retirando-se o conjunto de placas com os géis do suporte usado na montagem e encaixando-o na cuba inferior. Dentro das cubas superior e inferior foi inserido o tampão de eletrodo ou corrida. A tampa do conjunto foi encaixada, atentando-se para a conexão dos eletrodos.

A voltagem de corrida no gel de empilhamento foi fixada em 250 V e a corrente em 70 mA, acionada o início da corrida. A seguir, aguardou-se que a linha azul, formada pelo marcador de corrida (azul de bromofenol), ultrapassasse a linha

do gel de separação e a voltagem foi regulada para 280 V para a de corrida no gel de separação a corrente em 40 mA. A variação de amperagem foi acompanhada durante a corrida, diminuindo ao longo da mesma. O aquecimento do sistema também foi observado e a corrida foi realizada sob-refrigeração (cerca de 6°C) até que as amostras alcançassem o final do gel (cerca de 4 horas).

4.5.2.4 Revelação dos géis

Após o término da corrida eletroforética, foi feita a revelação dos géis em duas etapas. Na primeira, os géis foram mantidos à temperatura ambiente por 12 horas em uma solução corante e fixadora, contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 (1,17 mM), metanol (1,23 M), ácido tricloroacético (12,2 mM) diluídos em 100 mL de água purificada.

Na segunda etapa, os géis foram retirados da solução corante e fixadora e mantidos à temperatura ambiente em uma solução descorante, preparada com metanol (0,74 M) e ácido acético (0,13 M) diluídos em 100 mL de água purificada.

A conservação dos géis foi feita em solução contendo glicerol a 10% em água destilada seguida pela secagem dos mesmos entre duas folhas de papel celofane, conforme descrito por Alfenas e Brune (1998).

4.5.3 Preparo das amostras para análise pelo método SDS-PAGE

As amostras para análise foram dissolvidas em solução tampão, na proporção de 15 µL (0,135 mg/mL) para 500 µL (1:34), respectivamente. Para o preparo do tampão, utilizou-se tampão Tris/HCL (0,5 M/ 11 M) em pH 6,8; 80 µL glicerol; 1,6 mL SDS 10% m/v; 40 µL de β-mercaptoetanol; 20 µL de azul de bromofenol 4,0mL de água destilada em seguida, aqueceu-se a 95°C em banho-maria por 5 minutos. A seguir, foi centrifugado a 12.500 x g em temperatura ambiente por 15 minutos. Após preparadas, as amostras foram analisadas imediatamente. Como padrão utilizou o marcador de peso molecular *Novex Protein* (10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 80 kDa, 110 kDa, 160 kDa) e das proteínas o padrão (α_{s1} -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*)).

4.5.3.1 Preparo do gel de separação

O gel de separação foi preparado a 12,5% com: acrilamida/bisacrilamida (2 M/ 0,02 M) em tampão Tris/HCl (1,5 M) pH 8,8; 7,5 mL; 300 µL SDS 10% m/v; e água destilada 9,45 mL; 300 µL de persulfato de amônio (0,1 g/mL); 30 µL de TEMED. Seguindo o protocolo como descrito em “4.5.2.1. Preparo do gel de separação”.

4.5.3.2 Gel de Empilhamento

O gel de Empilhamento foi preparado a 4,9% com: acrilamida/bisacrilamida (2 M/ 0,02 M) em: acrilamida/bisacrilamida (2 M/ 0,02 M) em tampão Tris/HCL (0,5 M/ 11 M) em pH 6,8 1,25 mL; 50 µL SDS 10% m/v e 2,95 mL água destilada; 30 µL persulfato de amônio (0,1 g/mL); 20 µL TEMED seguindo o protocolo como descrito em “4.5.2.1. Preparo do gel de separação.”

4.5.3.3 Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Os protocolos utilizados nesta análise foram os mesmos descritos anteriormente no item “4.5.2.3 Aplicação das amostras e corrida eletroforética”. Os pentes foram retirados e os poços formados, guarnecidos com solução tampão de corrida preparado com Tris/Glicina/SDS (0,3 M/2,87 M/0,052 M) em água destilada suficiente para 3 L (solução estoque, pH 8,3). Esta solução foi diluída 5 vezes no momento do uso, utilizando-se o sistema tampão descontínuo descrito por Laemmli (1970) com modificações, conforme descrito.

Sendo assim, foram injetados 30 µL de amostra por poço. A voltagem de corrida no gel de empilhamento foi fixada em 80 V e a corrente em 40 mA, acionada no início da corrida. No gel de separação, a voltagem foi regulada para 200 V e a corrente em 20 mA. A variação de amperagem foi acompanhada durante o processo, diminuindo ao longo do mesmo. O aquecimento do sistema também foi observado e a corrida foi realizada sob-refrigeração (cerca de 6°C) até que as amostras alcançassem o final do gel (cerca de 5 horas).

4.5.3.4 Revelação dos géis

Após o término da corrida eletroforética no equipamento para eletroforese (SIGMA modelo Z35280-2) (Figura 6), foi feita a revelação dos géis em três etapas.

Na primeira, os géis foram mantidos por 30 minutos em solução fixadora à temperatura ambiente contendo 160 mL de metanol, 80g ácido tricloroacético P.A. em água destilada suficiente para 400 mL de solução final.

Na segunda etapa, os sistemas foram mantidos à temperatura ambiente por 12 horas em uma em solução corante contendo 1 g de azul brilhante de Comassie (Comassie Blue R-250); 400 mL de metano; 100 mL de ácido acético e 500 mL de água destilada.

Na terceira etapa, os géis foram retirados da solução corante e mantidos por 12 horas em solução descorante a temperatura ambiente preparada com 500 mL de metanol; 200 mL de ácido acético e água purificada suficiente para 1.300 mL.

A conservação dos géis foi feita em solução contendo glicerol a 10% em água destilada seguida pela secagem dos mesmos entre duas folhas de papel celofane, conforme descrito por Alfenas e Brune (1998).



Figura 6 - Equipamento para eletroforese SIGMA modelo Z35280-2.

4.5.3.5 Análise das imagens

Após a secagem dos géis suas imagens foram obtidas por um scanner acoplado ao computador. Em seguida, as mesmas foram analisadas pelo software (Image Quant TL V2005 da Amersham Biosciences-Buckinghamshire, Inglaterra), a partir do qual foram obtidos os dados da mobilidade eletroforética relativa de cada fração (banda) proteica identificada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas duas metodologias analíticas executadas (*lab-on-a-chip* e UREIA-PAGE), a α_{s1} -caseína constituiu um importante parâmetro molecular para a detecção de leite de vaca adicionado ao leite de cabra. Isso porque tal fração é maior quantitativamente no leite bovino que no leite caprino e tem maior mobilidade eletroforética (FURTADO, 1983; SGARBIERI, 2005; SALEM, 2009). Deste modo, este foi o parâmetro utilizado para avaliar os dois métodos.

5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD

As absorbâncias da proteína padrão BSA obtidas por espectrofotometria foram correlacionadas com as crescentes concentrações preparadas. Usando estas determinações foi construída uma curva de calibração, cuja equação de regressão linear foi $y=0,0481x+0,0044$, com coeficiente de correlação (R^2) de 0,98 (Figura 7). Desta forma, demonstrou-se que o método foi linear para a quantidade de proteína presente nas amostras em estudo.

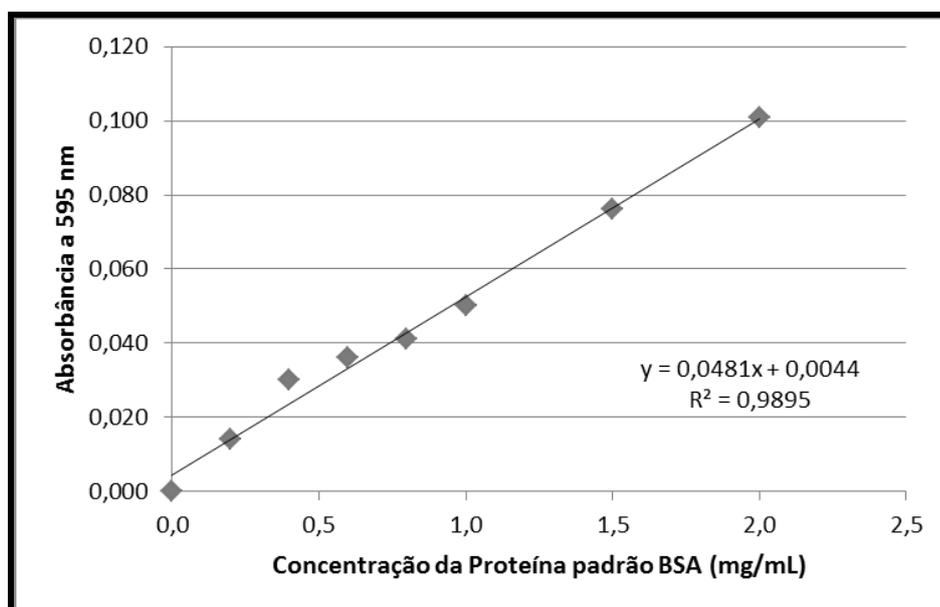


Figura 7 - Curva de calibração da proteína padrão BSA obtida pelo método de Bradford.

A média das concentrações das proteínas totais, obtidas pelo método de Bradford, foram 901,41 $\mu\text{g/mL}$ (UREIA-PAGE e SDS/PAGE) e 450 $\mu\text{g/mL}$ (*lab-on-a-chip*) e as geradas pela curva padrão da proteína BSA, apresentaram correlação entre o aumento da concentração de proteína e o aumento das absorvâncias.

As concentrações das amostras foram corrigidas pelo fator de diluição a que foram submetidas (1:25). Os valores quantificados foram utilizados para orientar os cálculos de diluição das amostras a fim de ajustar à faixa qualitativa do método *lab-on-a-chip*.

5.2 SEPARAÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO LEITE CRU CAPRINO, LEITE CRU BOVINO E SUAS MISTURAS PELO MÉTODO *LAB-ON-A-CHIP*.

5.2.1 Determinação Qualitativa

A massa molecular das proteínas do leite foi determinada com base no tempo de migração das proteínas do marcador de peso molecular padrão fornecido no *kit Protein 80 (Agilent Technologies)*, o qual é inserido no chip em cada análise. Os perfis eletroforéticos das caseínas padrão (Figura 8), do leite de cabra puro (Figura 9), do leite de vaca puro (Figura 10) foram evidenciados, bem como a sobreposição leite de vaca e leite de cabra (Figura 11).

O eletroferograma apresentado na Figura 8 apresenta os picos em ordem de migração das caseínas: β -caseína, α -caseína e a κ -caseína.

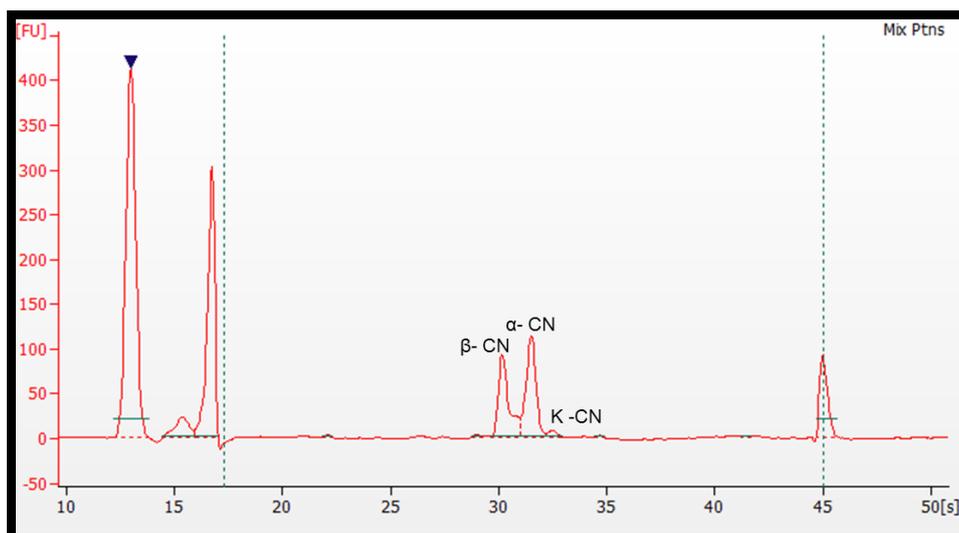


Figura 8: Perfil da corrida eletroforética do padrão de caseínas visualizado no eletroferograma pela tecnologia *lab-on-a-chip*. β -CN, α_{s1} -CN, e κ -CN.

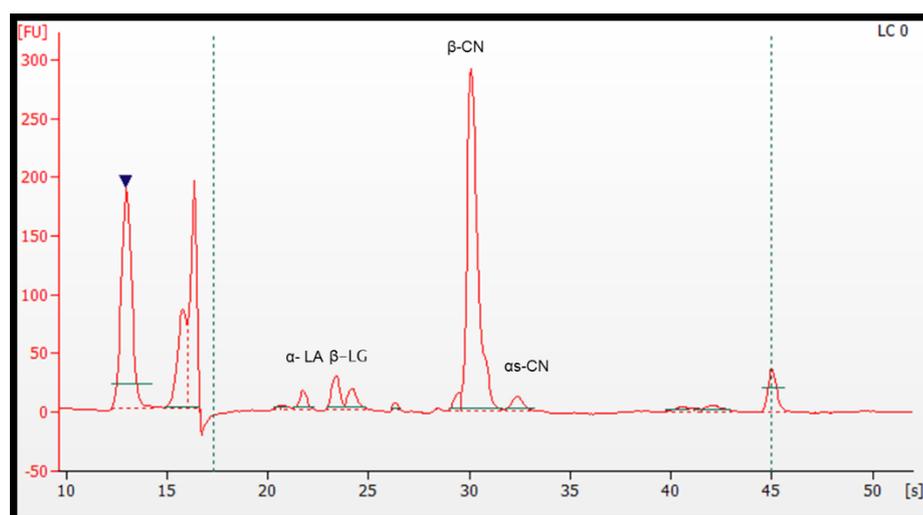


Figura 9 - Perfil da corrida eletroforética de amostra de leite de cabra visualizado no eletroferograma pela tecnologia *lab-on-a-chip*. α -LA, β -LG, β -CN e α_{s1} -CN caprina .

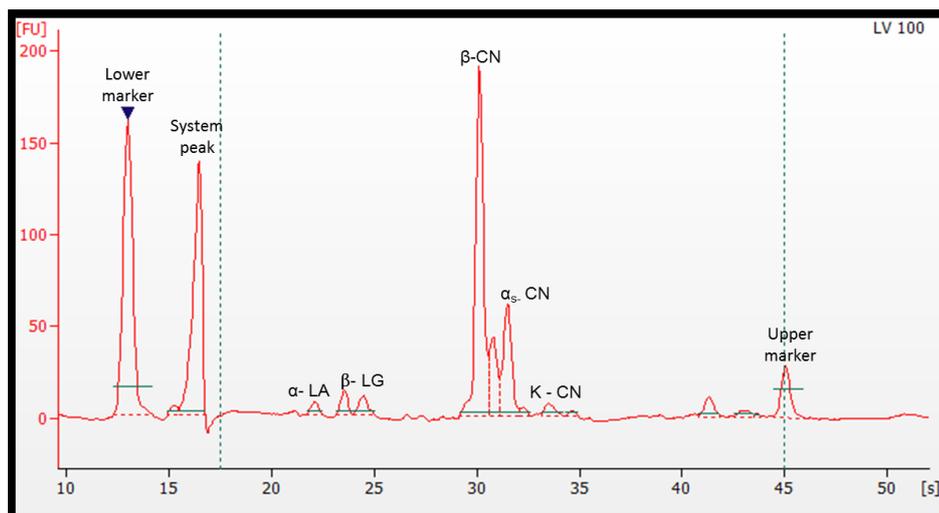


Figura 10 - Perfil da corrida eletroforética de amostra de leite de vaca visualizado no eletroferograma pela tecnologia *lab-on-a-chip*. α -LA, β -LG, β -CN, α_{s1} -CN bovina, k-CN bovina .

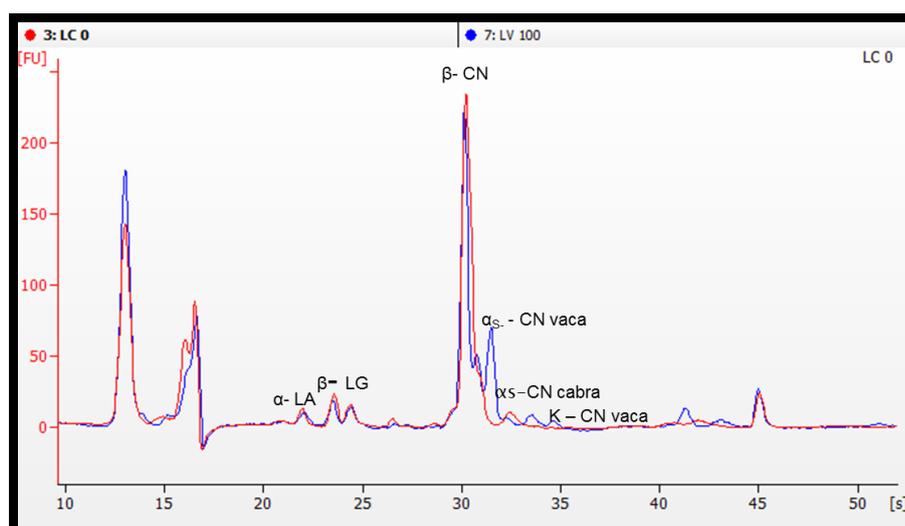


Figura 11 – Sobreposição dos eletroferogramas de amostras de leite de cabra puro (linha vermelha) e leite de vaca puro (linha azul), comparando as diferenças entre as amostras.

O método de eletroforese microfluídica em chip gera representações gráficas denominadas eletroferograma. Os resultados foram disponibilizados em eletroferogramas descritos abaixo (Figura 12). Neste painel podemos observar a mudança do perfil eletroforético do leite de cabra para o do leite de vaca na medida em que aumenta a adição de leite de vaca no leite de cabra.

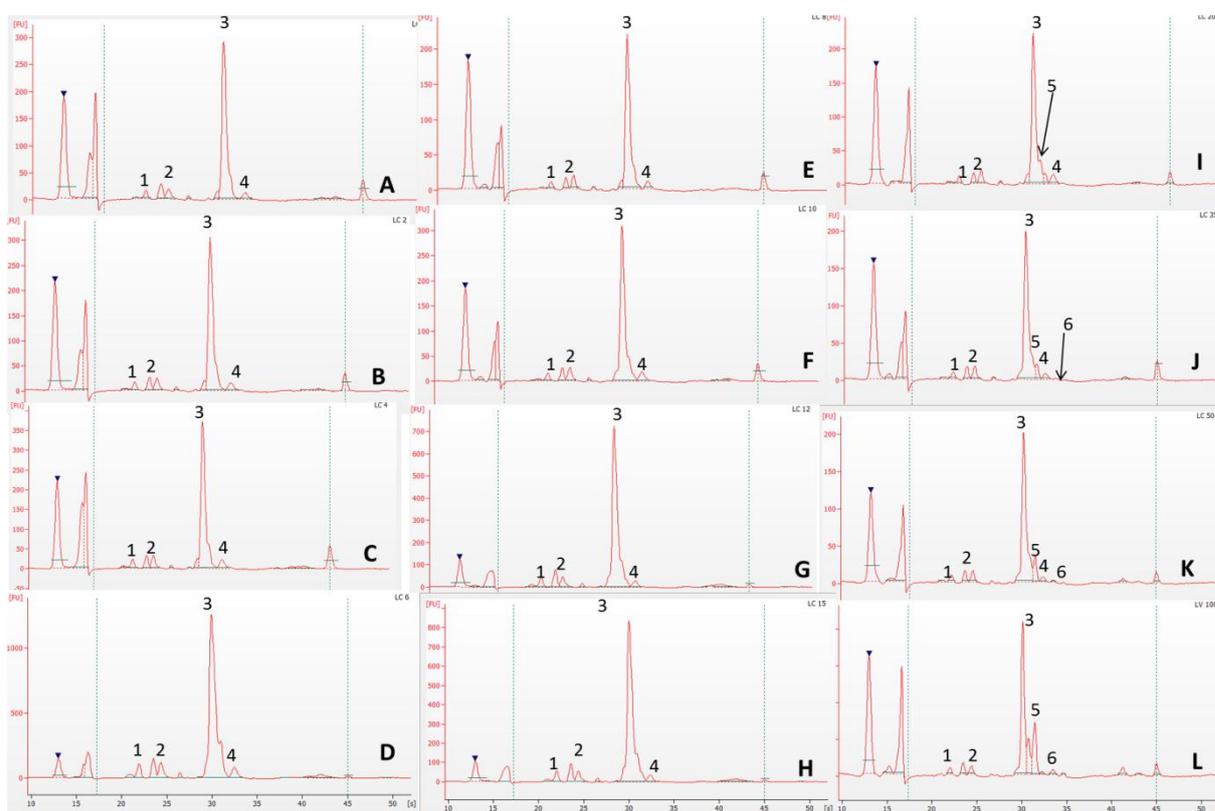


Figura 12 - Eletroferograma de amostra de leite de cabra puro e de misturas crescentes de leite bovino no leite caprino utilizando a tecnologia *lab-on-a chip*. **A** - Leite de cabra puro. **B** - Leite de cabra contendo 2% de adição de leite de vaca. **C** - Leite de cabra contendo 4% de adição de leite de vaca. **D** - Leite de cabra contendo 6% de adição de leite de vaca. **E** - Leite de cabra contendo 8% de adição de leite de vaca. **F** - Leite de cabra contendo 10% de adição de leite de vaca. **G** - Leite de cabra contendo 12% de adição de leite de vaca. **H** - Leite de cabra contendo 15% de adição de leite de vaca. **I** - Leite de cabra contendo 20% de adição de leite de vaca. **J** - Leite de cabra contendo 35% de adição de leite de vaca. **K** - Leite de cabra contendo 50% de adição de leite de vaca. **L** - Leite de vaca puro. **1** - α -lactoalbumina do leite caprino e bovino, **2** - β -lactoglobulina (variante A e B) do leite caprino e bovino, **3** - β -caseína do leite caprino e bovino, **4** - α_{s1} -caseína caprina, **5** - α_{s1} -caseína bovina, **6** - k-caseína bovina.

Nos eletroferogramas no painel I da Figura 12 observa-se o aparecimento do pico da área da α_{s1} caseína bovina representada pela seta preta. Assim como a presença da k-caseína bovina indicada pelo pico sinalizado com a seta preta no painel J da Figura 12.

As análises das amostras de leite bovino, leite caprino e suas misturas em proporções crescentes foram realizadas pela técnica de eletroforese capilar microfluídica com fluorescência induzida por laser, *lab-on-a-chip*. O método

conduzido com o uso de condições redutoras permitiu a rápida separação das proteínas do soro (α -LA, β -LG, variantes A e B) e das caseínas (α_{s1} -CN, β -CN variantes e κ -CN) na faixa de peso molecular entre 5 a 80 KDa.

Os eletroferogramas apresentados nas Figuras 12 evidenciaram que a β -caseína foi a primeira das caseínas a migrar na técnica estudada. Esta migração eletroforética microfluídica da β -caseína nos leites de cabra e vaca gerou peso molecular e tempo de migração semelhantes. No leite de cabra cru os dados do eletroferograma mostraram peso molecular (PM) de 33,2kDa com tempo de migração de 30,14 (s) (Tabela 2). Entretanto, durante a análise dos dados, foi observado um pico próximo da β -caseína com peso molecular (PM) 31,4 kDa e tempo de migração igual a 29,5 (s), que se manteve presente até o nível de 8% de adição de leite de vaca no leite de cabra. Furtado (1983a) e Salem (2009) relataram, em seus estudos, a presença destes dois picos que chamaram de variantes (β_1 e β_2), utilizando o método em gel de poliacrilamida em SDS. Sgarbieri (2005) define estas variantes como sendo mutações que ocorrem na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na sequência primária da cadeia polipeptídica

A β -CN bovina apresentou peso molecular de 33 KDa e o tempo de migração 30,13 (s)(Tabela 2). Assim na sobreposição do eletroferograma (Figura 12), os picos da β -caseína caprina e β -caseína bovina se sobrepõem, o que está de acordo com outros trabalhos (VELOSO, et al 2002b; PARDO e NATALUCCI, 2002).

Tabela 2 - Comparação das massas moleculares (KDa) das principais caseínas e proteínas do soro em análise referentes ao leite caprino e bovino, estimadas pelo método *lab-on-a-chip*.

Proteínas	Cabra		Vaca	
	Massa Molecular (KDa)	Tempo de Migração (s)	Massa Molecular (KDa)	Tempo de Migração (s)
α -LA	12,4	22,37	12,9	22,05
β -LG	18,2	23,23	18,5	24,4
β -caseína	33,2	30,14	33	30,13
α_{s1} -caseína	40,4	32,39	37,3	31,46
κ -caseína	--	---	43,7	33,46

A proteína α_{s1} -CN do leite de vaca apresentou PM de 37,3 KDa e tempo de migração de 31,46 (s), enquanto que a α_{s1} -CN do leite de cabra possuía PM de 40,4 KDa e tempo de migração 32,39 (s) (Tabela 2). Assim, a α_{s1} -caseína bovina possui

menor mobilidade eletroforética por apresentar o tempo de migração menor que o da α_{S1} -caseína caprina. Segundo ANEMA(2009) esta característica da α_{S1} -caseína bovina se deve ao tamanho hidrodinâmico adquirido pelas caseínas em condições eletroforéticas. Este aumento do tamanho hidrodinâmico torna as caseínas eletricamente mais carregadas negativamente em condições alcalinas em SDS.

A κ -caseína foi identificada no eletroferograma somente no leite bovino com peso molecular 43,7 kDa e tempo de migração 33,46 (s), não sendo encontrada no leite caprino. O peso molecular da κ -CN mais alto do que o observado no SDS convencional também foi relatado nos estudos do Anema (2009).

Nitsche (2011) explicou que esta proteína poderia sobrepor a β -LG, caso apresentasse o PM esperado de 19 kDa (Tabela 3) como na técnica de SDS-PAGE tradicional. Mas o elevado peso molecular de 42 kDa, obtido pela técnica microfluídica para κ -CN, pode ser explicado pela sua tendência de formar agregados tais como glicosilação, padrão de fosforilação e, acima de tudo, característica de hidrofobicidade que influencia na estrutura da proteína e na interação com o gel matriz durante a separação, aparentando um peso molecular maior do que o obtido por outras técnicas (CREAMER e RICHARDSON,1984; ANEMA,2009; NITSCHKE, 2011).

Tabela 3 - Comparação do peso molecular das principais proteínas do leite entre as técnicas SDS-PAGE e *lab-on-a-chip*.

Caseínas do Leite	Peso Molecular Estimado Microchip (kDa) ^a	Peso Molecular Estimado SDS (kDa) ^b
α -LA	12	14,2
β -LG	18	18,4
β -caseína	29	24,1
α_{S1} -caseína	33	23,6
κ -caseína	42	19,0

Fonte: ANEMA (2006)^a; BUFFONI et al. (2011)^a, FARRELL JR et al. (2004)^b

As proteínas usadas como indicador de fraude foram as caseínas α_{S1} e κ -caseínas. A α_{S1} -caseína foi escolhida em razão da diferença de sua massa molecular no leite caprino em relação ao leite bovino e por apresentar maior mobilidade eletroforética. Já a κ -caseína, se deve ao fato de que no *chip* ser possível visualizá-la somente no leite bovino.

Com relação às proteínas do soro, o método permitiu a eluição semelhante entre α -LA e β -LG para os leites das diferentes espécies. O peso molecular

encontrado para α -LA foi de 12,4 kDa (leite caprino) e 12,9 kDa (leite bovino). Deste modo, os pesos moleculares não diferenciaram dos encontrados no experimento e os relatados na literatura (Tabela 2 e 3). O tempo de migração para a α -LA foi de 22,37(s) para leite caprino e 22,05 para leite bovino (Tabela 2).

Buffoni et al (2011) separaram e quantificaram as principais proteínas do soro de leite de búfala pelo método de *lab-on-a-chip*, RP-HPLC e espectrofotometria de massa. Nas amostras, utilizando-se a técnica microfluídica em *chip*, os resultados encontrados para α -LA e β -LG em relação ao tempo de migração foram semelhantes ao encontrado neste estudo.

Entretanto, ocorre o aparecimento de um pico próximo a β -LG no leite bovino e misturas com pesos molecular de 16 kDa. Sgarbieri (2005) e Anema (2009), em suas citações, relataram a existência de uma variante desta proteína denominada β -LG A e β -LG B com peso molecular próximo ao encontrado neste experimento.

Pesic et al. (2011a, 2011b), ao estudarem o leite de diferentes espécies e suas misturas, utilizaram o método de eletroforese em gel de poliacrilamida nativo. No *native*-PAGE verificaram o aparecimento de duas bandas menos intensa no leite de cabra e de ovelha referentes às variantes β -LG A e β -LG B que se intensificavam com a progressiva adição de soro de leite bovino. Nos densitogramas observaram que os picos referentes as variantes β -LG A e β -LG B aumentaram com o crescente aumento de soro de leite bovino.

Nesta técnica foram realizadas análises com as simulações de fraudes descritas anteriormente e mais os níveis de 12 e 15%. Estes níveis foram acrescentados para verificar se haveria alterações qualitativas e estreitar a faixa analítica. Entretanto não foi observada diferença em relação às demais, quando se analisou os géis visualmente e os eletroferogramas. Realizou-se também a extração de caseínas das amostras de leite caprino, leite bovino e das misturas, com o intuito de concentrá-las para melhorar a sensibilidade do método e evidenciar a k-caseína do leite caprino, mas nenhuma diferença qualitativa foi observada.

5.2.2 Determinação Quantitativa

Os resultados das frações proteicas de interesse foram analisados utilizando as informações quantitativas individuais geradas nas corridas pelo *software* Agilent 2100 Expert. Assim, foram gerados dados da área dos picos e porcentagem (%) total de proteínas, analisadas pelo método estatístico SPSS versão 20.0. Os dados foram tabulados entre a porcentagem (%) total de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino para gerar a equação de regressão linear (Tabela 4 e Figura 13).

Tabela 4 - Regressão linear entre a porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.

Proteína	Equação de Regressão	n	R	r ²	p
α-LA	$Y = 4,21 - 0,15x$	9	0,009	0,003	0,000
β - LG	$Y = 4,21 - 0,15x$	9	0,057	0,068	0,000
β - CN	$Y = 74,502 - 22,971x$	9	0,706	0,498	0,000
α-CN vaca	$Y = -1,356 + 18,744x$	4	0,986	0,973	0,000
α-CN cabra	$Y = 4,464 - 2,869x$	8	0,322	0,104	0,000
K - CN vaca	$Y = -0,172 + 2,697x$	3	0,788	0,621	0,000

A equação de regressão linear gerada ao plotar os dados entre a porcentagem total e os níveis crescentes de mistura de leite caprino com leite bovino, para análise das proteínas β-caseína caprina e a β-caseína bovina apresentou um coeficiente de correlação $R=0,706$, $R^2=0,498$, expressando baixa linearidade devido aos pontos dispersos na curva (Tabela 4 e Figura 16).

O mesmo observou-se ao plotar os dados entre a área dos picos e os níveis de adição de leite bovino no leite caprino, um coeficiente de correlação $R=0,645$ $R^2=0,416$ (Tabela 5). Esta correlação justifica a sobreposição das proteínas em questão, que apresentaram os pesos moleculares e tempo de migração semelhantes.

A α-caseína no método *lab-on-a-chip* mostrou resultados estatisticamente significativos para a α_{s1}-caseína bovina e α_{s1}-caseína caprina. Sendo assim, o experimento apresentou curva e equação de regressão linear característica para cada fração. Para a α_{s1}-caseína caprina, o coeficiente de regressão linear foi de $R=0,322$, $R^2=0,104$ (Tabela 4) e $R=0,433$ e $R^2=0,188$ (Tabela 5). Estes valores de coeficiente de regressão linear foram baixos distantes de um, demonstrando que esta proteína tem pouca linearidade com pontos dispersos na curva e resultados

estatísticos menos significativos. O fato de o valor de n (número de amostras analisadas) para a proteína α_{s1} -caseína caprina ser um valor alto ($n=8$), com R^2 baixo, corrobora a informação de que esta proteína é menos significativa, não contribuindo como uma proteína indicadora para este tipo de fraude. (Tabela 4 e Tabela 5).

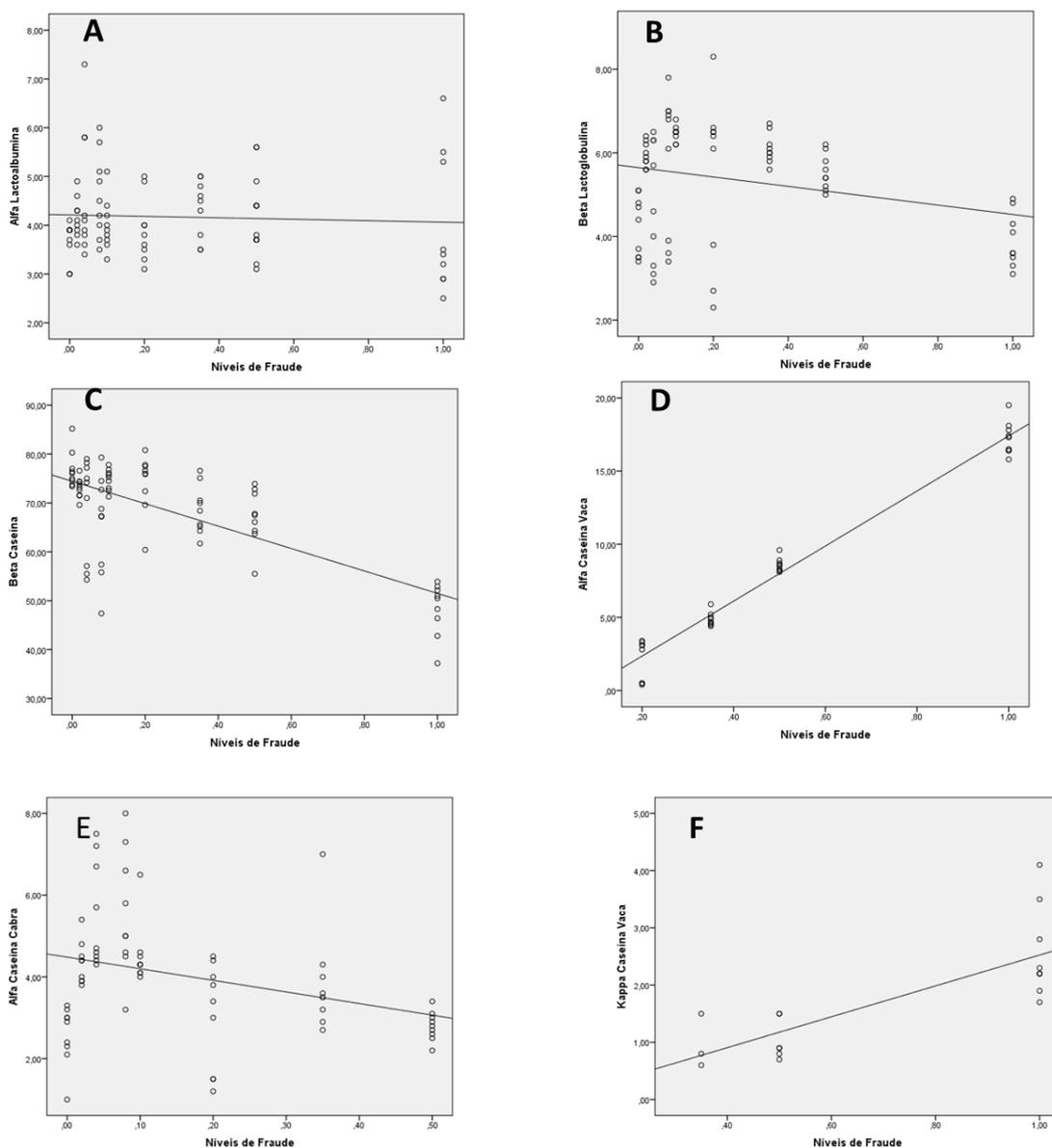


Figura 13 - Demonstração gráfica da regressão linear obtida pela porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino. **A** - α -Lactoalbumina do leite caprino e bovino, **B** - β -lactoglobulina do leite caprino e bovino, **C** - β -caseína do leite caprino e bovino, **D** - α_{s1} caseína bovina, **E** - α_{s1} caseína caprina, **F** - κ -caseína bovina.

Os dados relativos a fração α_{s1} -caseína bovina geraram uma equação de regressão linear entre a porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com resultados positivos. Estes valores de coeficientes de regressão $R=0,986$, $R^2=0,973$ foram mais próximos de um, determinando a maior linearidade da α_{s1} -caseína bovina dentre as caseínas estudadas.

O mesmo perfil foi observado para regressão linear entre a da área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com leite caprino que teve coeficiente de regressão linear $R=0,966$ e $R^2=0,932$. A α_{s1} -caseína bovina foi a caseína que apresentou os melhores resultados, a melhor reta, os pontos mais alinhados e significância estatística ($p=0,000$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Regressão linear entre a área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.

Proteína	Equação de Regressão	n	r	r ²	p
α -LA	$Y= 6,66 - 1,65x$	9	0,058	0,069	0,000
B-LG	$Y= 9,69 - 3,84x$	9	0,172	0,183	0,000
B-CN	$Y=157,343 - 78,621x$	9	0,645	0,416	0,000
α -CN vaca	$Y=-2,956 + 35,575x$	4	0,966	0,932	0,000
α -CN cabra	$Y=10,502 - 10,607x$	8	0,433	0,188	0,000
K-CN vaca	$Y=-0,239 + 5,372x$	3	0,701	0,491	0,000

A k-CN foi a fração identificada no leite bovino não sendo evidenciada no leite de caprino (Tabela 4 e 5). Na análise estatística, apresentou um coeficiente de correlação $R=0,788$, $R^2=0,621$ para a porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino e $R=0,701$, $R^2=0,491$ para área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com caprino. Assim, a curva teve pontos alinhados com boa linearidade (Figura 14). As proteínas do soro de leite caprino e bovino mostraram um comportamento semelhante. A regressão linear entre a porcentagem total (%) de proteínas e os níveis de misturas de leite bovino com leite caprino indicou coeficiente de correlação $R=0,009$ e $R^2=0,003$ para α -LA, $R=0,057$ e $R^2=0,068$ para β -LG. O mesmo aconteceu na regressão linear entre a área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com caprino onde apresentou coeficiente de variação próximo de $R=0,058$ e $R^2=0,069$ para α -LA, $R=0,172$ e $R^2=0,183$ para β -LG.

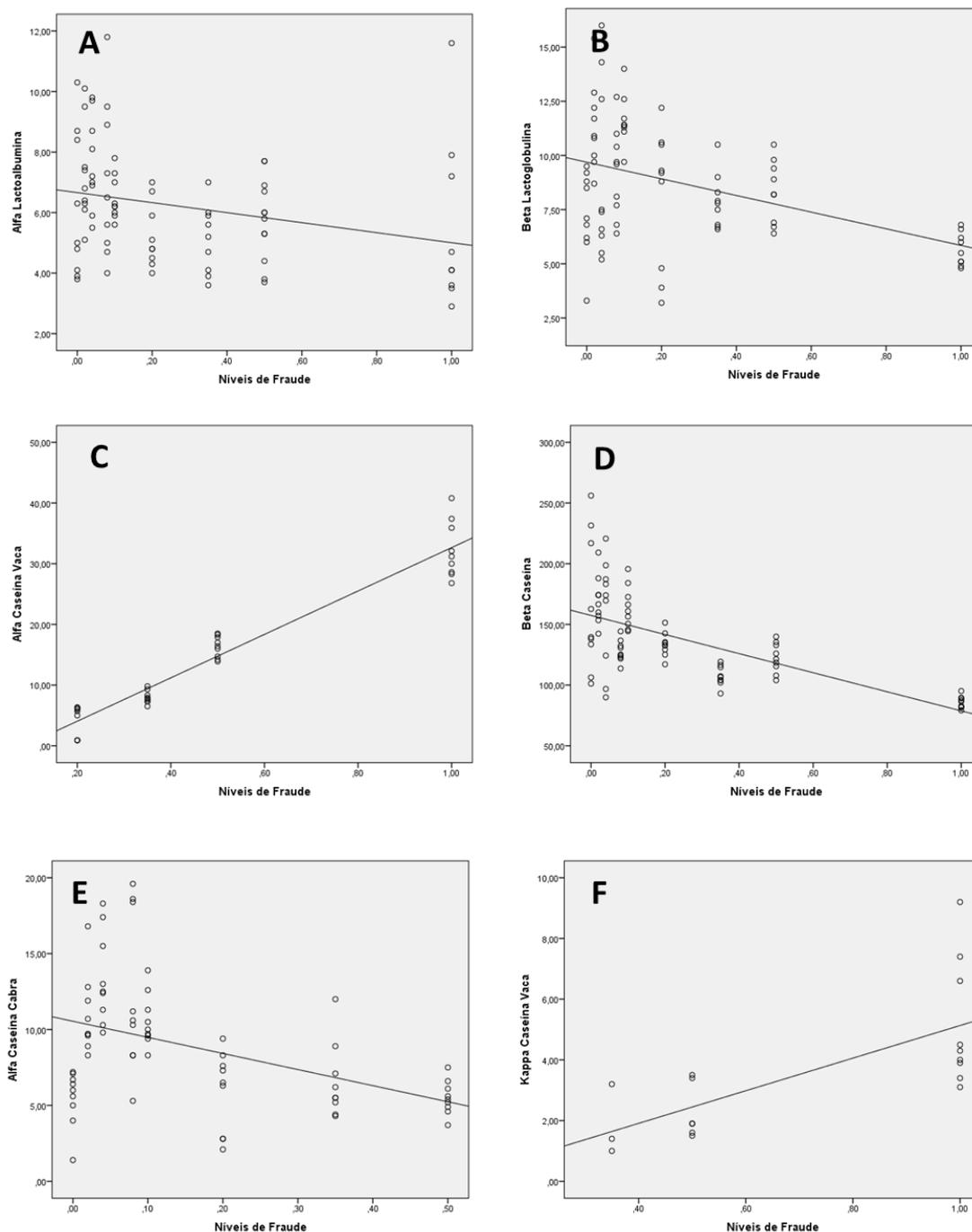


Figura 14 - Demonstração gráfica da regressão linear entre a área dos picos e os níveis de mistura de leite bovino com caprino. **A** - α -lactoalbumina do leite caprino e bovino, **B** - β -lactoglobulina do leite caprino e bovino, **C** - α_{S1} -caseína bovino. **D** - β -caseína do leite caprino e bovino. **E** - α_{S1} -caseína caprina, **F** - κ -caseína bovina.

A análise de regressão dos dados apresentados nas Figuras 15 e 16 e nas Tabelas 4 e 5 revelaram uma estreita correlação entre os percentuais de leite bovino adicionados no leite caprino e nas proporções relativas às principais proteínas dos

leites individuais. Os valores elevados dos coeficientes de correlação indicam que o método *lab-on-a-chip* pode ser uma boa ferramenta para detectar a presença da α_{s1} -caseína bovina no leite caprino adicionado de leite bovino.

Tanto para a porcentagem de proteínas totais, quanto para os dados da área dos picos, todas as proteínas se mostraram correlacionadas, sendo que em ambos os casos a proteína α_{s1} -caseína da vaca é a que apresentou o melhor ajuste e maior correlação com as duas variáveis (porcentagem de proteínas totais e área dos picos).

Com o aumento da adição do leite bovino no leite caprino as faixas frontais da proteína α -LA apresentaram uma pequena oscilação em suas médias, entre 3,67 a 4,66. O mesmo ocorreu para as proteínas β -LG e β -CN, porém com intervalos um pouco maiores, de 3,86 a 6,47 para a primeira e de 48,34 a 76,86 para a segunda (Tabela 6).

Tabela 6 - Média de porcentagem (%) de proteínas obtidas a partir de diferentes misturas de leite caprino/bovino.

Adição	α -LA	β -LG	α -LA+ β -LG	β -CN
0% L.Cabra	3,67 \pm 0,40	3,86 \pm 0,71	7,53 \pm 1,11	76,86 \pm 3,75
2% bovino	4,17 \pm 0,41	5,96 \pm 0,29	10,13 \pm 0,70	73,08 \pm 2,03
4% bovino	4,66 \pm 1,33	4,74 \pm 1,48	9,4 \pm 2,81	69,06 \pm 10,36
8% bovino	4,62 \pm 0,87	5,83 \pm 1,71	10,45 \pm 2,58	65,6 \pm 10,17
10% bovino	4,0 \pm 0,52	6,47 \pm 0,19	10,47 \pm 0,71	74,79 \pm 2,15
20% bovino	3,87 \pm 0,68	5,32 \pm 2,21	9,19 \pm 2,89	73,69 \pm 5,93
35% bovino	4,33 \pm 0,6	6,1 \pm 0,36	10,34 \pm 0,42	68,6 \pm 4,98
50% bovino	4,21 \pm 0,83	5,53 \pm 0,42	9,74 \pm 1,25	67,06 \pm 5,67
100%L.Vaca	3,98 \pm 1,44	3,91 \pm 0,65	7,89 \pm 2,09	48,34 \pm 5,43

A proteína α -LA se mostra mais evidente com nível de fraude de 4% do leite bovino no leite caprino. A proteína β -LG se mostra mais evidente com 10% de leite bovino no leite caprino (Tabela 6).

Conforme já relatado anteriormente e demonstrado na Tabela 6, a proteína β -CN tem um comportamento diferente de outras proteínas, pois se mostra mais evidente no leite caprino (0%) e menos no leite bovino (100%). Swaisgood (1995), Greppi (2008) e Hinz (2012) relataram a diferença da porcentagem da β -caseína caprina e bovina. Sendo que a β -caseína aparece em maior proporção no leite

caprino. O mesmo não acontece com a α_{s1} -CN e a β -LG que apresentaram-se em maiores níveis no leite bovino. Sendo estas frações proteicas as mais alergênicas e antigênicas, elas fazem do leite bovino um importante causador de alergia no segmento mais sensível da população: as crianças (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001; SGARBIERI, 2005).

Analisando o gráfico apresentado na Figura 15, percebe-se, pela média da área ocupada pelas proteínas, a forte presença da proteína β -CN, tanto no leite caprino e bovino puro, quanto nas simulações crescentes da adição de leite de vaca ao leite de cabra.

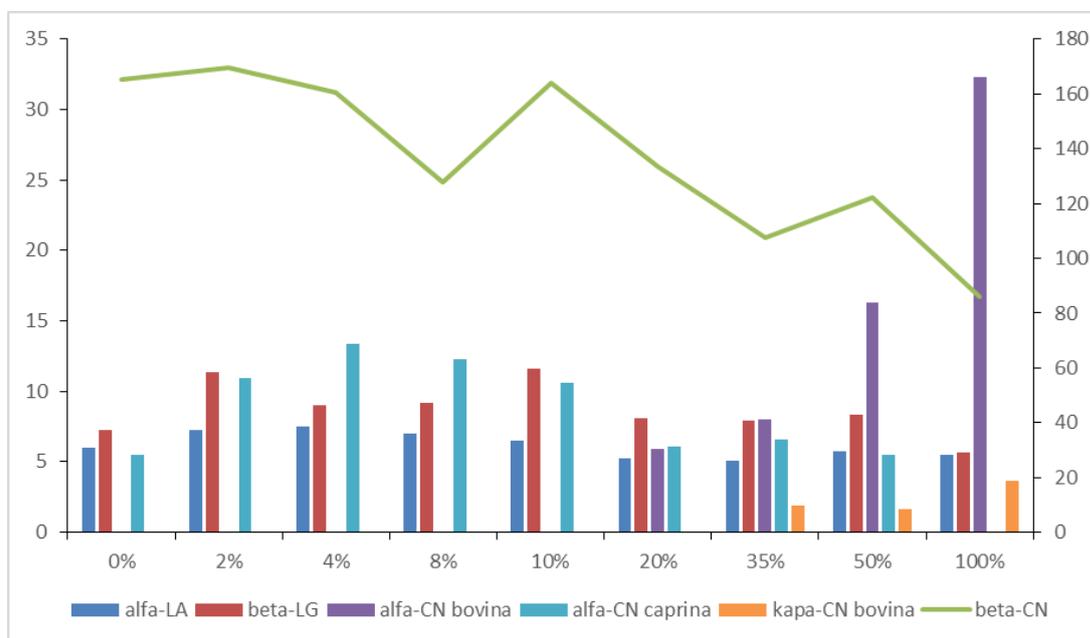


Figura 15 – Distribuição da média das áreas ocupadas pelas proteínas utilizando amostras de leite de cabra puro, leite de vaca puro e misturas crescentes de adição de leite bovino ao leite caprino obtida pela tecnologia *lab-on-a-chip*. No gráfico de barra com sobreposição, está representada pela reta de cor **verde** a β -caseína caprina e bovina. No eixo das abscissa a barra de **cor azul** representa a α -lactoalbumina, a barra de **cor marrom** a lactoglobulina, a barra de **cor azul escura** a α -caseína bovina, a barra de **cor azul clara** a α -caseína caprina, a barra de **cor laranja** a k-caseína bovina.

O método *lab-on-a-chip* detecta a fraude a partir de 20% de leite bovino adicionado ao leite caprino, com isso, pode-se evidenciar a presença das proteínas α_{s1} -caseína bovina e k-caseína caprina na porcentagem de 20, 35 a 50 e 100%. A fração proteica da α_{s1} -CN do leite bovino na adição de 20% não apresentou uma área maior que a α_{s1} -CN do leite caprino, mas à medida que se adicionou leite

bovino, essa proteína ultrapassou a outra, e quando se teve 50% de leite bovino e 50% de leite caprino, a proteína α_{s1} -caseína do leite de vaca se mostrou mais presente que a proteína α_{s1} -caseína do leite de cabra. Sobre a fração da κ -caseína bovina, observou-se o aumento da área na porcentagem de 35, 50% de adição, 100% (leite de vaca genuíno).

Kaminarides e Koukiassa (2002) evidenciaram em seus experimentos utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de leite bovino adicionado ao iogurte de leite de ovelha, a presença no gel de uma banda referente a para-k-caseína. Esta banda foi observada no gel do iogurte de leite bovino puro e suas misturas não sendo evidenciadas nesta amostra de iogurte de leite de ovelha puro. Os autores chamaram este pepetideo de marcadora de detecção de leite bovino adicionado ao iogurte de leite de ovelha.

Do mesmo modo, a k-caseína na técnica *lab-on-a-chip* pode ser considerada como sendo a proteína marcadora para diferenciar leite de cabra de leite de vaca, visto que, em tal método ela é detectada no leite bovino. No entanto, para a detecção de fraude de leite caprino com leite bovino, o método apresentou sensibilidade para a identificação de leite de vaca a partir de uma adição de 20% com a detecção da presença α_{s1} -caseína bovina.

Buffoni, (2011), Anema, (2009) testaram a metodologia para separação de proteínas de leite de diferentes espécies, obtendo separação satisfatória para as proteínas avaliadas. Além da vantagem da agilidade nas análises laboratoriais, o método *lab-on-a-chip* não exige a exposição constante a reagentes tóxicos comumente utilizados nos métodos convencionais, a análise dos dados é automatizada, o que permite a obtenção rápida de resultado e disponibilizam informações qualitativas, quantitativas individuais das frações de interesse.

Considerando que a União Europeia estabeleceu como método de referência a focalização isoelétrica baseada na caseína- γ para detectar a presença de leite bovino adicionado ao leite caprino e ovino (*Commission Regulation*, 1996) e que no Brasil não existe método validado para detectar esse tipo de fraude, a tecnologia de eletroforese microfluídica pode ser aplicada como um método de triagem.

5.3. COMPARAÇÃO DA SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS USANDO O MÉTODO TRADICIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E A TECNOLOGIA *LAB-ON-A-CHIP*

Ao comparar o método tradicional em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com o método *lab-on-a-chip*, o método de SDS-PAGE tradicional fundamenta-se na migração das proteínas pela diferença de massas moleculares (ALFENAS,1998). Sendo assim, aquelas proteínas que tem o menor peso molecular, terão maior mobilidade eletroforética e eluirão primeiro. Assim o método *lab-on-a-chip* usa a eletroforese capilar microfluídica com fluorescência induzida por laser e também baseia-se na migração das proteínas pela diferença de massas moleculares. O método eletroforese microfluídica em chip realiza a separação das proteínas do leite traçando seu perfil eletroforético. Os resultados são disponibilizados com rapidez, tendo grande importância nas investigações de fraude de leite para laboratórios de rotina. O método microfluídico é uma excelente alternativa ao método tradicional SDS-PAGE, pois utiliza pouca quantidade de amostra e reagentes, gerando pouca quantidade de produtos químicos tóxicos que precisam ser descartado. A contaminação do ambiente ou o tratamento de seus resíduos é drasticamente reduzido. A análise é rápida e automatizada. O treinamento do pessoal técnico é fácil (ANEMA, 2006; BUFFONI, 2011).

A Figura 16 apresenta o gel obtido com a técnica de SDS-PAGE para as amostras de leite de vaca e cabra, além dos padrões de proteínas lácteas (α_{s1} -caseína; β -caseína; e κ -caseína; β -lactoglobulina; α -lactoalbumina) e o marcador de PM.

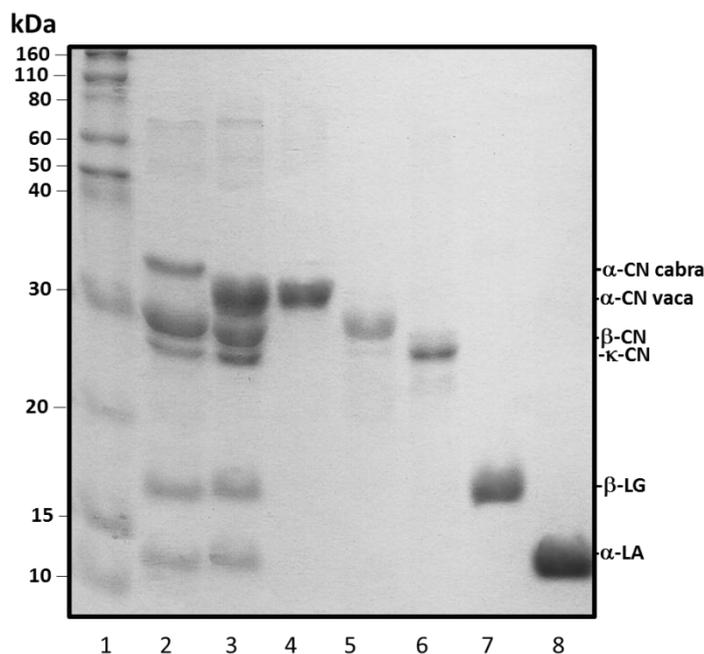


Figura 16 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida (12,5%) das amostras de leite de vaca, leite de cabra. **1**- Marcador de peso molecular *Novex Protein*, **2** - Leite de cabra puro, **3** - Leite de vaca puro, **4** - Proteína purificada α -caseína de vaca, **5** - Proteína purificada β -caseína de vaca, **6** - Proteína purificada κ -caseína de vaca, **7** - Proteína purificada α -lactoalbumina de vaca, **8** - Proteína purificada β -lactoglobulina de vaca. α -CN caprina, α -CN bovina, β -CN, κ -CN, β -LG, α -LA.

As principais proteínas lácteas a β -caseína e α -caseína na técnica *lab-on-a-chip* e SDS-PAGE tradicional apresentaram massa molecular comparáveis nas duas técnicas utilizadas. No entanto, a massa molecular para κ -CN obtida foi mais elevada na técnica *lab-on-a-chip* comparada com a técnica de SDS, conforme observado nas Tabela 2, 3 e 7. NITSCHKE, 2011 corrobora com esta afirmativa ao relatar em sua pesquisa uma massa molecular para a κ -caseína significativamente maior (quase o dobro) na técnica eletroforética microfluídica que a obtida pela técnica de SDS-PAGE tradicional.

A α_{s1} -caseína neste método confrontado com o gel de poliacrilamida em presença de ureia apresentou um comportamento diferente. A α_{s1} caseína migrou primeiro que a β -caseína no gel de UREIA-PAGE, no entanto no gel de SDS-PAGE a caseína que migrou na frente foi a β -caseína. Sendo que nas duas espécies de mamífero estudados a α_{s1} bovina migrou primeiro e com melhor visualização os métodos de UREIA-PAGE (EGITO, et al. 2006).

Tabela 7 - Comparação da massa molecular das principais proteínas do leite caprino e bovino pelo método SDS-PAGE.

Proteínas do Leite	Leite caprino (KDa)	Leite bovino (KDa)	Proteínas padrão (KDa)
α -LA	12,34	12,56	12,87
β -LG	16,50	16,63	17,05
κ -CN	26,21	25,72	27,35
β -CN	28,15	28,03	28,79
α_{s1} -CN	30,18	29,94	29,97

Cramer e Richardson (1984) atribuíram o comportamento anômalo da α_{s1} -caseína bovina ao aumento do tamanho hidrodinâmico nas condições eletroforéticas. Este aumento deve-se a distribuição de carga em regiões altamente negativa. Considerando que estas regiões carregadas negativamente, especialmente em α_{s1} -CN, podem adotar uma conformação estendida em presença de SDS, assim tal proteína adquire um tamanho aparentemente aumentado e uma migração mais lenta em condições de SDS-PAGE, e migra depois da β -caseína o que explicaria o comportamento da α_{s1} -caseína bovina na técnica SDS-PAGE.

Salem et al (2009) revelaram que o padrão eletroforético pela técnica de SDS-PAGE evidenciou que no leite de vaca, as caseínas foram separadas nas duas maiores frações, α_s -CN com 56,5% e β -CN com 43,5% das caseínas totais. Enquanto no leite de cabra, duas caseínas também foram separadas, mas a β -caseína foi dominante, 70,2% quando comparada com a α_s -CN, 29,8%.

Não foi notada diferença na migração eletroforética das principais proteínas do soro como relatado no trabalho de Salem, (2009), que percebeu que a β -LG no leite caprino foi mais rápida e a α -LA foi mais lenta quando comparado com as respectivas do leite bovino.

5.4 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PELO METODO EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) E EM PRESENÇA DE UREIA (UREIA-PAGE).

As amostras analisadas neste método foram: 0 (Leite de cabra puro), 2, 4, 6, 8, 10, 20, 35, 50,100 v/v (Leite de vaca puro). A escolha do método eletroforético em gel de poliacrilamida foi baseada na melhor separação e identificação das proteínas

do leite de diferentes espécies. Ao comparar o perfil eletroforético das técnicas de SDS-PAGE com o da técnica de UREIA-PAGE já descrita por PEREIRA, 2003; EGITO, 2006; SALEM, 2009, este último método foi o mais favorável.

A Figura 17 (A) mostra a mobilidade eletroforética das frações de caseínas no gel de UREIA PAGE nos leites de vaca e de cabra. Esse método revelou a migração das três bandas superiores com maior intensidade correspondendo à κ -caseína, β -caseína (banda com maior intensidade) e α_{s1} -caseína, onde a α_{s1} bovina tem maior mobilidade, maior fator de retenção que a α_{s1} caprina. Nas frações das proteínas do soro as bandas apresentam-se com pouca intensidade ou não são bem evidenciadas neste método (URBAN, 2002; SALEM, 2009; HINZ, 2012).

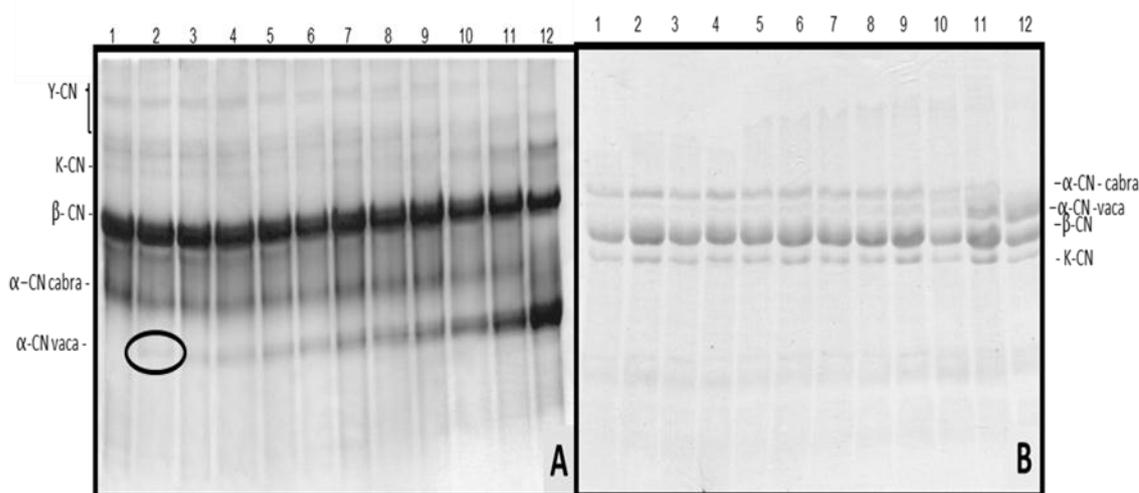


Figura 17 – Comparação do perfil eletroforético do leite de cabra e leite de vaca em gel de poliácridamida. **A** - Perfil eletroforético em gel de poliácridamida (10%) em presença de ureia das amostras de leite de cabra, leite de vaca e adições crescentes de leite de vaca no leite de vaca. **B**- Perfil eletroforético em gel de poliácridamida (12,5%) em presença de SDS das amostras de leite de cabra, leite de vaca e adições de leite de vaca em leite de cabra. **1**- Leite de cabra Cru (0%), **2** - Leite de cabra com 2% de adição de leite de vaca. **3** - leite de cabra com 4% de adição de leite de vaca. **4** - Leite de cabra com 6% de adição de leite de vaca. **5** - Leite de cabra com 8% de adição de leite de vaca. **6** - Leite de cabra com 10% de adição de leite de vaca. **7** - Leite de cabra com 12% de adição de leite de vaca. **8** - Leite de cabra com 15% de adição de leite de vaca. **9** - Leite de cabra com 20% de adição de leite de vaca. **10** - Leite de cabra com 35% de adição de leite de vaca. **11** - Leite de cabra com 50% de adição de leite de vaca. **12** - Leite de Vaca Cru. α -CN caprina, α -CN bovina, β -CN, κ -CN, γ -CN.

A Figura 17(B) no gel de SDS-PAGE no leite de cabra vaca e misturas não apresentou uma boa resolução na separação das bandas eletroforéticas e o perfil eletroforético não foi nítido como no método UREIA-PAGE.

Na Figura 18 pode-se visualizar os perfis eletroforéticos dos leites de cabra (A), de vaca (L) e das adições crescentes de leite bovino ao leite caprino de (B) a (K) identificados nos densitogramas abaixo pelo método UREIA-PAGE.

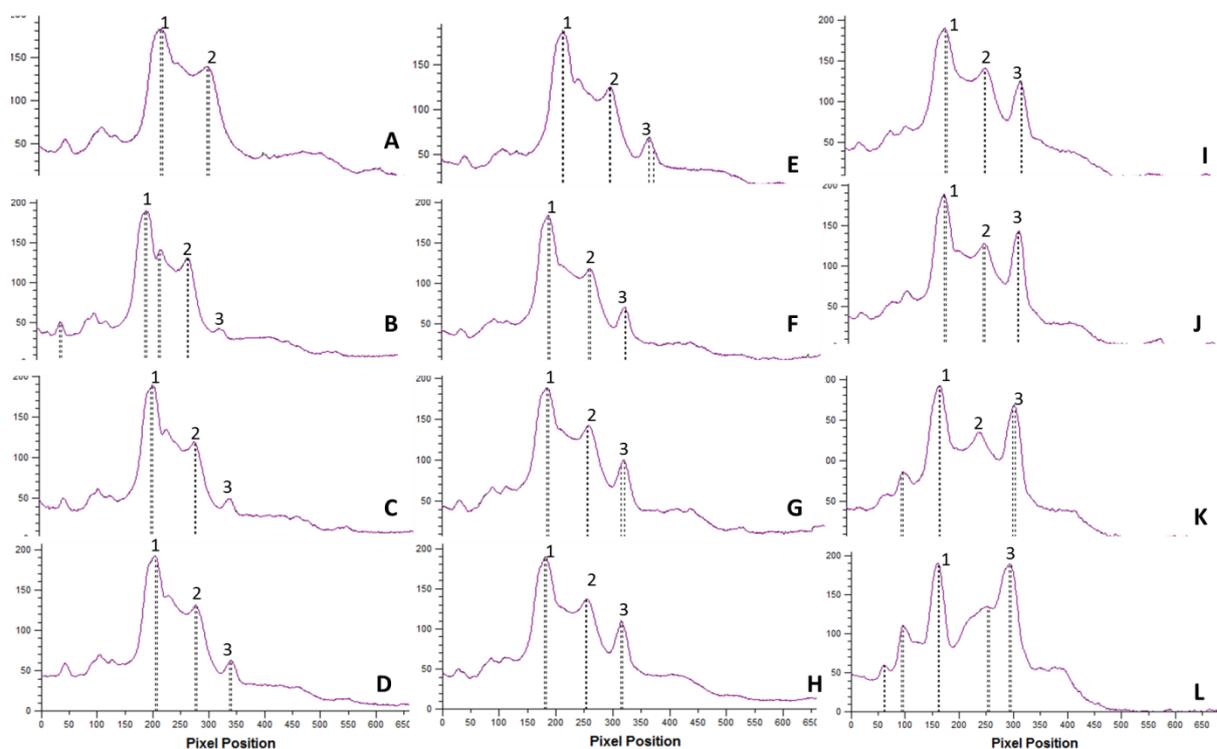


Figura 18 - Densitogramas do leite de cabra de amostras de leite de cabra adicionado com leite de vaca em gel poliácridamida UREIA-PAGE. **A** – Leite de cabra puro. **B** – Leite cabra com 2% de adição de leite de vaca. **C** - Leite cabra com 4% de adição de leite de vaca. **D** - Leite cabra com 6% de adição de leite de vaca. **E** - Leite cabra com 8% de adição de leite de vaca. **F** - Leite cabra com 10% de adição de leite de vaca. **G** - Leite cabra com 12% de adição de leite de vaca. **H** – Leite de cabra com 15% de adição de leite de vaca. **I** - Leite cabra com 20% de adição de leite de vaca. **J** - Leite cabra com 35% de adição de leite de vaca. **K** - Leite cabra com 50% de adição de leite de vaca. **L** – Leite de vaca puro. 1 - β -CN, 2 - α -CN caprina, 3 - α -CN bovina.

Os perfis obtidos nestas condições tiveram densitogramas que revelaram valores de massas moleculares das principais proteínas dos leites de cabra e de vaca aceitável quando comparadas às proteínas padrões utilizadas como referência na técnica (Tabela 7).

Nestes géis foram usadas as simulações de fraudes descritas anteriormente e mais os níveis de 12 e 15%. Estes níveis foram acrescentados por orientação estatística para enriquecer os resultados, mas, não foi observada diferença significativa com os demais resultados.

5.5 PERFIL ELETROFORETICO DAS PROTEINAS PELO MÉTODO EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE UREIA (UREIA-PAGE)

5.5.1 Determinação Qualitativa

O método de UREIA-PAGE foi o mais apropriado para a detecção do leite de vaca misturado ao leite de cabra, pois evidenciou com mais nitidez a migração rápida da caseína α_{s1} -CN bovina alcançando uma boa resolução na separação das bandas eletroforéticas, demonstrando, inclusive, perfis eletroforéticos muito nítidos para as triplicatas analisadas, provavelmente devido ao método ser baseado na migração das proteínas sob a influência da massa molecular e da carga elétrica. (PEREIRA, 2003).

A Figura 19 ilustra os perfis eletroforéticos das amostras obtidos pela aplicação desta técnica apresentados em seus géis de corrida. Os percentuais de fraudes foram distribuídos nos géis em poços conforme delineamento experimental em bloco incompleto e desbalanceado. As amostras de referência utilizadas foram o leite caprino genuíno e o leite bovino genuíno.

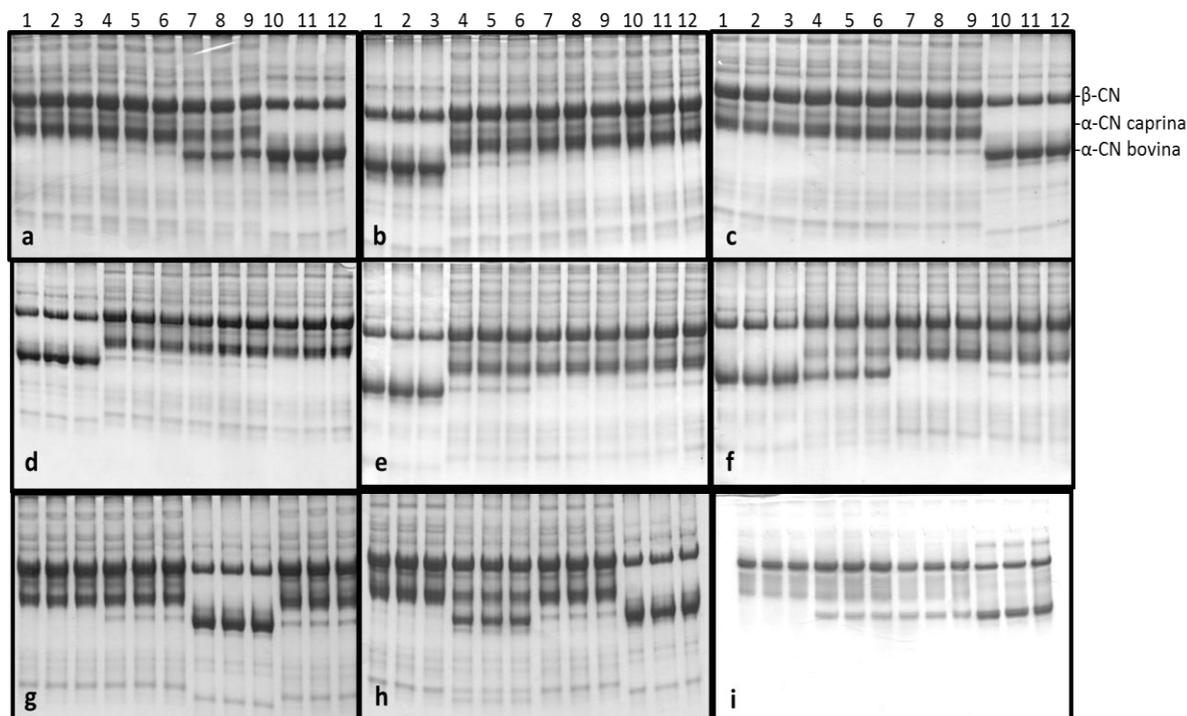


Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com ureia de amostras de leite de cabra adicionado com leite de vaca

Leite de Cabra Cru (0%): **a.** 1-3, **b.** 10-12, **c.** 1-3, **d.** 10-12, **f.** 7-9, **g.** 1-3, **i.** 1-3

Leite de vaca Cru (100%): **a.** 10-12, **b.** 1-13, **c.** 10-12, **d.** 1-3, **e.** 1-3, **f.** 1-3, **g.** 7-9, **h.** 10-12, **i.** 10-12

Leite de cabra com 2% de adição de leite de vaca: **b.** 7-9, **e.** 7-9, **h.** 1-3

Leite de cabra com 4% de adição de leite de vaca: **c.** 4-6, **d.** 7-9, **f.** 10-12

Leite de cabra com 6% de adição de leite de vaca: **a.** 1-3, **e.** 10-12, **e.** 4-6

Leite de cabra com 8% de adição de leite de vaca: **b.** 4-6, **d.** 4-6, **h.** 7-9

Leite de cabra com 10% de adição de leite de vaca: **c.** 7-9, **e.** 4-6, **g.** 10-12

Leite de cabra com 20% de adição de leite de vaca: **i.** 7-9

Leite de cabra com 35% de adição de leite de vaca: **i.** 4-6

Leite de cabra com 50% de adição de leite de vaca: **a.** 7-9, **f.** 4-6, **h.** 4-6
 β -CN , α -CN caprina, α -CN bovina .

No densitograma (Figura 18) do leite de cabra (A) e de vaca (L) observou-se a presença de um pico relativo à β -CN com mobilidade similar nas duas amostras. Mas, o pico referente a β -CN do leite de cabra, apresentou uma subdivisão que caracteriza as duas variantes desta proteína (β_1 e β_2 - CN) presentes no leite desta espécie o que não se observou no leite de vaca.

Estas variantes de β -CN caprina já foram descritas em outros experimentos baseados em SDS-PAGE e foram denominadas de β_1 -CN e β_2 -CN com massa molecular determinada em 26,6 kDa e 23,9 kDa, respectivamente, concluindo-se

que ambas são similares com relação à carga elétrica e à massa molecular (FURTADO, 1983 a; SALEM, 2009).

A β -CN é o maior componente proteico do leite de cabra (70,2%), contra (29,85%) para α_{s1} -CN. No leite de vaca foram descritas como 43,5% e 56,5%, respectivamente (FURTADO, 1981; SALEM, 2009; SGARBIERI, 2005).

Nos géis de UREA-PAGE apresentados na Figura 19 as β -CN se sobrepõem formando uma banda com uma coloração mais intensidade e menor mobilidade, justificado pela menor carga e maior massa molecular. A mobilidade da fração α_{s1} CN bovina e caprina são distintas, nos densitogramas com picos característicos a uma distância menor no leite de cabra e maior para o leite de vaca mostrando a mobilidade levemente mais rápida da α_{s1} CN bovina. Hinz, (2012) estudando o leite de diferentes espécies (vaca, camela, égua, búfala e cabra) em gel de UREA PAGE observou que esta mobilidade difere entre as espécies. Mas a α_{s1} CN bovina apresenta a maior mobilidade, seguida pela α_{s1} CN de camela, búfala e cabra.

Dessa forma, a distinção entre as amostras é facilitada, podendo ser efetuada, preferencialmente, pelo aparecimento ou não da banda com maior mobilidade, característica do leite de vaca, e que se apresenta em concentração crescente (área do pico crescente ou cor da banda mais intensa) em leite de cabra adicionado de quantidades também crescentes de leite de vaca.

Segundo Horne e Parker (1982), a caseína do leite caprino apresenta menor intensidade de carga negativa que a bovina, mesmo com remoção do cálcio (indicado como responsável por esta menor intensidade de carga). Isso justifica a menor mobilidade das caseínas caprinas em relação às bovinas no gel de eletroforese em condições alcalinas. Furtado (1983) e Salem (2009) destacam que o componente de maior mobilidade eletroforética no leite caprino, designado α_{s1} -CN, representou uma proporção muito menor da caseína total quando comparada com que a α_{s1} -CN bovina e tem também a menor massa molécula estimada 30,2 kDa. O teor de caseína α_{s1} variou, segundo alguns experimentos, em 29% das caseínas caprinas (JAUBERT, 1992). Esta é, provavelmente, a causa destas variações observadas nos perfis proteicos do leite de cabra.

A mobilidade da κ -CN caprina, é descrita na literatura, como muito semelhante à da β -CN, nem sempre aparecendo em eletroforese em pH alcalino. Sendo necessário fazer um tratamento específico para o isolamento desta fração

proteica. Quando este isolamento é realizado esta proteína, assim como peptídeos de baixo peso molecular são detectados em géis com bandas nítidas e visíveis como descrito por Pardo e Natalucci (2002).

A ausência, em leite de cabra, de qualquer componente com mobilidade eletroforética similar à da α_{s1} -CN bovina pode ser usado para detecção de adição de leite de cabra por leite de vaca. A α_{s1} CN utilizada pode ser, portanto, utilizada como uma proteína marcadora de fraude.

Praticamente, todos os métodos eletroforéticos descritos para detectar misturas de leites se basearam na maior mobilidade eletroforética no gel da α_{s1} -CN bovina em relação à caseína de maior mobilidade constituinte do leite de cabra, de forma que a presença desta fração se manifesta pela visualização de um pico à frente de todos os demais picos no densitograma de leite de cabra adicionado com leite de vaca e ausente no densitograma típico do leite de cabra genuíno. Esta é a mais óbvia diferença entre os perfis eletroforéticos de proteínas caprinas e bovinas e foi observada sobre gel de poliacrilamida contendo ureia que não foi tão evidenciado na técnica de SDS-PAGE.

Os resultados obtidos da análise de amostras de leite de cabra adicionadas de leite de vaca em diferentes percentuais, simulando as fraudes que se deseja controlar pela aplicação desta metodologia, foram avaliados inclusive para definição do limite mínimo de detecção.

A observação dos géis e densitogramas permite indicar os perfis típicos de leite de cabra e leite de vaca, conforme simulações de fraudes 0% e 100%. Ao avaliar as amostras de leite de cabra adicionadas de quantidades crescentes de leite de vaca, pôde-se observar a transição gradual de um perfil similar ao leite de cabra a partir do percentual de 2%. A partir daí, ocorreu similaridade crescente com o leite de vaca, notada inicialmente pelo aparecimento de uma banda de coloração mais intensa na região da α_{s1} -CN bovino, que aumenta em função do percentual crescente de leite de vaca adicionado. No mesmo sentido, observou-se bandas de coloração menos expressiva no gel do perfil do leite caprino. A detecção de fraudes pela adição de leite de vaca ao de cabra pode ser então confirmada a partir de 2%.

Segundo Egito et al. (2006), detectaram a adição de leite de vaca ao leite de cabra com um limite mínimo de 2,5% de adição sendo que em seu estudo utilizaram técnicas de extração antes da realização da eletroforese UREIA-PAGE e neste

estudo foi utilizado o leite integral na realização da eletroforese UREA-PAGE sem nenhuma extração.

Salem et al. (2009) e Hinz et al. (2012), ao compararam o perfil eletroforético das caseínas de diferentes espécies de mamíferos utilizando UREA-PAGE, corroboraram a informação de que a adição de leite bovino ao caprino pode ser detectada pela presença da banda da α_{s1} -CN no gel eletroforético.

5.5.2 Determinação Quantitativa

De acordo com a Tabela 8 e Figura 20, a análise de avaliação dos dados revelou valores elevados de coeficientes de correlação. A equação de regressão linear das porcentagens das frações proteicas (β -CN, α_{s1} -CN cabra e α_{s1} -CN vaca) em relação ao total de caseína revelou consideráveis valores de correlação.

Tabela 8 - Regressão linear entre a porcentagem total (%) das caseínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino.

Proteína	Equação de regressão	n	R	R ²	Valor p
β - CN	$Y=55,02 - 9,47x$	10	0,466	0,22	0,000
α - CN cabra	$Y=43,53 - 60,77x$	9	0,808	0,65	0,000
α - CN vaca	$Y=4,40 + 53,42x$	9	0,979	0,96	0,000

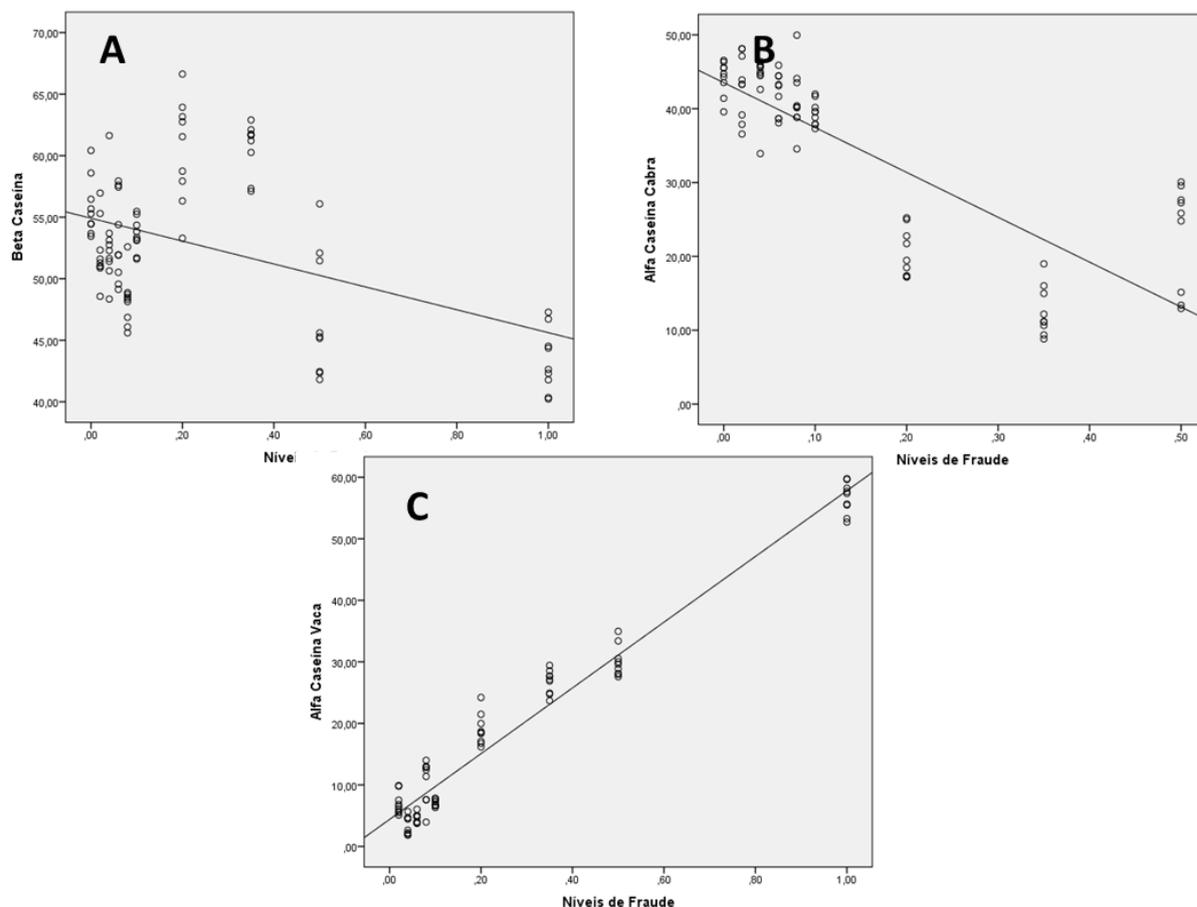


Figura 20 - Demonstração gráfica regressão linear entre a porcentagem total (%) das caseínas e os níveis de mistura de leite bovino com caprino. A - β -caseína, B - α -caseína caprina, C - α -caseína bovina.

Demonstrou-se ainda que os picos de β -CN caprina e bovina se sobrepuseram, sendo o fator de retenção ($R_f=0,22$ β -CN cabra e $R_f=0,23$ β -CN vaca) dos mesmos bastantes próximos. Entretanto, observou-se um coeficiente de correlação $R=0,466$, $R^2=0,22$ com valores abaixo, mas com resultados estatisticamente significativos ($p=0,000$).

Sendo a α_{s1} -CN que apresentou melhor correlação é a α_{s1} -CN da vaca, por apresentar um coeficiente de correlação $R=0,98$, $R^2=0,96$, fator de retenção $R_f=0,43$ estabelecendo linearidade entre a intensidade da banda e a porcentagem de adição crescente de leite bovino de 2 a 100%, tornando a sua concentração diretamente proporcional ao percentual analisados.

A elevada correlação desta fração proteica indica que a α_{s1} -caseína bovina constitui um marcador eficiente para detectar e traçar o perfil eletroforético do leite de vaca adicionado ao leite de cabra. Assim, a análise pelo método em gel de poliacrilamida em presença de ureia (UREIA-PAGE) apresentou bons resultados

estatísticos, com precisão para detectar pela análise das caseínas a adição do leite bovino ao leite caprino.

Conforme os resultados apresentados, a técnica UREIA-PAGE foi mais sensível para detectar adições a partir de 2% de leite bovino ao leite caprino em relação a técnica *lab-on-a-chip*.

6 CONCLUSÃO

- Concluiu-se que as amostras de simulações de fraude avaliadas neste trabalho utilizando a tecnologia *lab-on-a-chip* detectou a presença da caseína α_{s1} bovina com um limite mínimo de detecção de 20% de adição de leite de vaca ao leite de cabra e da k-caseína com um limite mínimo de 35% de adição de leite bovino ao leite caprino.
- O método de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de ureia (UREIA-PAGE), utilizando as mesmas amostras de simulação de fraude estudadas na tecnologia *lab-on-a-chip*, teve o limite mínimo de detecção em 2% de adição de leite de vaca ao leite de cabra.
- Os dois métodos estudados eletroforese, microfluídica *lab-on-a-chip* e UREIA-PAGE, traçaram o perfil eletroforético das caseínas e tiveram como marcador de detecção de fraude a caseína α_{s1} bovina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida UREIA-PAGE confrontado neste estudo com a eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* apresentou um limite de detecção menor. Assim é interessante que novos testes que utilizem o gel em presença de ureia como *gel matrix* introduzido no *chip* sejam feitos.

Considerando que a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida tradicional teve sua condição redutora baseada na presença de ureia e obteve melhor resultado que a técnica de eletroforese *lab-on-a-chip* com um limite de detecção mais baixo, faz-se necessário sugerir alterações nos reagentes do kit como uma alternativa para melhorar sua sensibilidade uma vez que esta técnica se baseia na redução das proteínas com SDS.

A eletroforese microfluídica *lab-on-a-chip* apresenta algumas vantagens relevantes tais como rapidez, menor quantidade de resíduos produzido durante a análise, utilização de menor quantidade de reagentes e automatização comparada com a eletroforese em gel de poliacrilamida tradicional SDS-PAGE e UREIA-PAGE por estas razões a continuação deste estudo deve ser realizada no intuito de aprimorar esta tecnologia para diminuir o limite de detecção encontrado nesta pesquisa.

A tecnologia *lab-on-a-chip* poderá auxiliar a órgãos oficiais no controle da qualidade de alimentos lácteos e derivados na análise de fraude de leite de diferentes espécies, como método de triagem utilizando como marcador a proteína caseína α 1-bovina.

REFERENCIAS

ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. **Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. v. 1, 574 p.

ALFENAS, A. C; BRUNE, W. Eletroforese em gel de amido. In: Alfenas. A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 115-150. 574p.

ALVES, R. N.; PACIULLI, S. O. D.; ORTIZ, G. P. T.; ARAÚJO, R. A. B. M.; TELES, R. V.; FONSECA, L. M.; COSTA, M. S. Influência da qualidade do leite “in natura” sobre as características físico-químicas do leite pasteurizado na indústria de laticínios do CEFET-BambuÍ. **I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí**, 2008. Disponível em: < http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Alimentos/27-PT-2.pdf>. Acesso em 29 jun. 2013.

ANDRADE, P. V. D.; SOUZA, M. R.; BORGES, I.; PENNA, C. F. A. M. CONTAGEM DE células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 3, p. 396-400, 2001.

ANEMA S. G. The use of “Lab-on-a-chip” microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 198–204, 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 5.ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011.

BORÉM A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 374 p.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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>. Acesso em 5 out. 2009.

BRASIL, L. H. A.; BONASSI, I. A.; BACCARI JÚNIOR, F.; WECHSLER, F. S. Efeito da temperatura ambiental na densidade e ponto de congelamento do leite de cabra. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 333-37, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Aprova Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. Instrução Normativa nº 37, de 31 de Outubro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 nov. 2000, Seção 1, Página 23.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Justiça. Ministério da Agricultura. Informações Gerais. Composição Química do Leite. **Cquali Leite** – Monitoramento da Qualidade do Leite. 2008. Disponível em:
<<http://www.qualidadedoleite.gov.br/data/Pages/MJ8F0048E8ITEMIDFBD8A1EB007A4CADBEF09F29C15C6431PTBRNN.htm>>. Acesso em 12 jun. 2013.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Composição**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência de Informação Embrapa – Agronegócio do Leite. 2007. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em 28 jul. 2013.

BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. The importance for growth of dietary intake of calcium and vitamin D. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, p. 386-94, 2008.

BUFFONI, J. N.; BONIZZI, I.; PAUCIULLO, A.; RAMUNNO, L.; FELIGINI, M. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Food Chemistry**, v.127, p. 1515-20, 2011.

BUNNER, J.R. Milk proteins. In: WHITAKER, J.R.; TANNENBAUM, S.R. (Eds.). **Food proteins**. AVI Publishers Company, Inc., 1977. 602 p., p.175-208.

BUZINARO, E. F.; ALMEIDA, R. N. A.; MAZETO, G. M. F. S. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 852-61, 2006.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 149-64, 2010.

CARVALHO, G. R. A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. Embrapa. **Circular Técnica**, 102. Juiz de Fora, 2002. 11 p.

CENACHI, D. B. **Desenvolvimento de leite de cabra fermentado prebiótico com baixo teor de lactose adicionado de β -ciclodextrina**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Fora, Juiz de Fora, 2012.

CHAPAVAL, L.; OLIVEIRA, A. A. F.; ALVES, F.S.F.; ANDRIOLI, A.; ARAÚJO, A. M.; OLVINDO, C. S. **Manual do produtor de cabras leiteiras**. Aprenda Fácil. Viçosa, MG. 2006. 214 p.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentárias**. Zaragoza: Editora Acribia, 1989. 346 p.

CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; KOBASHIGAWA, E. Relação entre atividade de plasmina e frações de caseína durante o armazenamento do leite longa vida. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 29-33, 2013.

CREAMER, L. K.; RICHARDSON, T. Anomalous behavior of bovine α_{s1} - and β - caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 234, p. 476-486, 1984.

CUNHA, F. L. **Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e contagem de células somáticas em leite de cabra produzido na região de Nova Friburgo-RJ. Metodologia tradicional versus metodologia eletrônica**. 2007. 74 f. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

DELACROIX-BUCHET, A; LAMBERT, G. **Sensorial properties and typicity of goat dairy products**. Tours/France: International Association of Goat, p. 559-63. 2000.

DEL VAL, G.; YEE, B. C.; LOZANO, R. M.; BUCHANAN, B. B.; ERMEL, R. W. FRICK, O. L. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.103, n.4, p.690-697, 1999.

DUBEUF, J. P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v. 51, n.1, p. 165-173, 2004.

DUQUE, L. P. Estratégias para o Aumento do Consumo de Leite Longa Vida através do Estudo do Comportamento do Consumidor e suas Implicações ao Agronegócio. **XXXII Encontro da ANPAD**. Rio de Janeiro, 2008.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDE, 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**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 932-39, 2006.

ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; GIVENS, D. I.; GALLACHER, J. E. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular diseases and diabetes: an overview of the evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p. 925-39, 2010.

ELWOOD, P. C.; IAN GIVENS, D.; BESWICK, A. D.; FEHILY, A. M.; PICKERING, J. E.; GALLACHER, J. The Survival Advantage of Milk and Dairy Consumption: an Overview of Evidence from Cohort Studies of Vascular Diseases, Diabetes and Cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 723S–734S, 2008.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais - 2010/2011**. 2012. Disponível em: <www.cnpql.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0210.php>. Acesso em 04 ago. 2013.

EVERSTINE, K.; SPINK, J.; KENNEDY, S. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 723-35, 2013.

FAIRCHILD, A.; LEE, M. D.; MAURER, J. J. PCR basics. **PCR Methods in Foods**, New York: Ed. Springer, N.Y. p. 1-25, 2006.

FERNANDES, V. G.; MARICATO, E. Análises físico-químicas de amostras de leite cru de um laticínios em Bicas- MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 375, p. 3-10, 2010.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. N.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cow's milk. **Sixth Revision Journal of Dairy Science**, n. 87, p. 1641-1674, 2004.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, SRINIVASAN; DAMODARAN, SRINIVASAN; PARKIN, KIRK L. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

FONSECA, L. F. L., SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175p, 2000.

FOOD SCIENCE. **Physical properties of milk**. 2009. Disponível em: <<https://www.uoguelph.ca/foodscience/dairy-science-and-technology/dairy-chemistry-and-physics/physical-properties-milk>>. Acesso em: 29 junh. 2013.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

FURTADO, M. M. Caracterização eletroforética das caseínas alfa e beta do leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 38, n. 226, p.27-29, 1983a.

FURTADO, M. M. Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 9, p. 1822-1824, 1983b.

FURTADO, M. M. Leite de cabra: características especiais. Seu uso na alimentação. Intolerância. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, n. 81, p. 31 – 37, 1981.

GERRIOR, S.; BENTE, L.; HIZA, H. **Nutrient Content of the U.S. Food Supply, 1909-2000**. Home Economics Research Report No. 56. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. 2004. 158 p.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. *In*: GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p; 31-47, 2003.

GONZÁLEZ, F. H. D, DURR, J. W., FONTANELLI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. **Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. 77p.**

GREPPI. G. F.; RONCADA P.; FORTIN R. **Protein Components of Goat's Milk**. Disponível em: <<http://bionanotech.uniss.it/wp-content/uploads/2011/09/15-Roncada-Greppi.pdf>>. Acesso em: 26/06/2013.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Modern Genetic Analysis**. New York: W. H. Freeman; 1999.

HADJIPANAYIOTOU, M. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewe and goats. **Small Ruminant Research**, v.18, p. 255-262, 1995.

HAENLEIN, G. F. W.; WENDORFF, W. L. Sheepmilk - Production and utilization of sheep milk. *In*: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**. Oxford: Blackwell Publishing Professional, 2006, p. 137-194.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-88, 2006.

HAYDEN, M. J.; NGUYEN, T. M.; WATERMAN, A.; CHALMERS, K. J. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. **BMC Genomics**, v. 9, n. 80, p. 1-12, 2008.

HINZ, K.; O'CONNOR, P. M.; HUPPERTZ, T.; ROSS, R. P.; KELLY, A. L. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. **Journal of Dairy Research**, v.79, p.185-191, 2012.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Some aspects of ethanol stability of caprine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 459-468, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Nacional. **Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil – 1980/2010***. 2012. Disponível em:

<www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php>. Acesso em 04 ago. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de dados agregados SIDRA. **Censo agropecuário 2006**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. 777 f. Disponível em <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2013.

JARDIM, W.R. **Criação de caprinos**. São Paulo: Nobel, 1984. 239 p.

JAUBERT, A. V. **Influence de divers paramètres physico-chimiques (pH, température, force ionique) sur la composition et les caractéristiques structurales de la micelle de caséine caprine**. 1992. 107 f. Tese (Docteur de l'ENSAR – Physico-chimie des bioproduits) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes, France. 1992.

KAMINARIDES S. E.; KOUKIASSA, P. Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para - κ - casein". **Food Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 53-55, 2002.
KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrases. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 90, n. 3, p. 249-254, 2003.

LACROIX, M.; BOS, C.; LÉONIL, J., AIRINEI, G.; LUENGO, C.; DARÉ, S.; BENAMOUZIG, R.; FOUILLET, H.; FAUQUANT, J.; TOMÉ, D.; GAUDICHON, C. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 1070 –9, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMPE, J. W. Dairy products and cancer. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5 (S1), p. 464S-70S, 2011.

LE JAOUEN, J.C. Milking and the technology of milk and milk products. In: GALL, C. (Ed.). **Goat production**. London: Academic Press, 1981. p. 345-377.

LOPES, M. A.; SANTOS, G.; CARVALHO, F. M. Comparativo de indicadores econômicos da atividade leiteira de sistemas intensivos de produção de leite no Estado de Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 458-465, 2012.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, 2000. Capítulo 5, p.179-231.

MALDONADO, J.; GIL, A.; NARBONA, E.; MOLINA, J. A. Special formulas in infant nutrition: A review. **Early Human Development**, v.53, sup. 1, p.23-32, 1998.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MBWANA, J.; BOLIN, I.; LYAMUYA, E.; MHALU, F.; LAGERGARD, T. Molecular characterization of *Haemophilus ducrey* isolates from different geographical locations. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 1, p. 132-37, 2006.

MEDEIROS, L. C.; SPERIDIÃO, P. G.; SDEPANIAN, V. L.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M. B. Ingestão de nutrientes e estado nutricional de crianças em dieta isenta de leite de vaca e derivados. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 363-70, 2004.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JACOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 349-52, 2010.

MENDES, R.S., NÓBREGA, G.H., SILVA, A.M.A., AZEVEDO, S.A., SILVA, G.L.S., MANGUEIRA, M.F.M.; OLIVEIRA, M.D. Avaliação do consumo e da produção de leite de cabras suplementadas com diferentes fontes de lipídeos. Em: **Anais do III Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**. João Pessoa. Paraíba. 2007.

MIKHEEVA, L. M.; GRINBERG, N. V.; GRINBERG, V. Y.; KHOKHLOV, A. R.; DE KRUIF, C. G. Thermodynamics of micellization of bovine β -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v. 19, p. 2913-21, 2003.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). **Food proteins: processing applications**. Wiley-VCH, Inc., 2000. p.1-21.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. 119-26, 2012.

MORAND-FEHR, P.; SANZ SAMPELAYO, M.R.; FEDELE, Y.V.; LE FRILEUX, Y.; EKNAES, M.; SCHMIDELY, P.H.; GIGER REVERDIN, S.; BAS, P.; RUBINO, R.; HAVREVOLL, O.; SAUVANT, D. Effets del' alimentation sur la qualite du lait et des fromages de chevres. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7, 2000, France. **Proceeding**. France: IGA, 2000.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **TREE**, v. 14, p. 389-94, 1999.

MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3515-22, 2012.

NITSCHKE, R. **Milk protein analysis with the Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent Protein 80 kit**. Agilent Technologies, Inc. Waldbronn, Germany, 2011. 7 p.

O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: effect of casein micelle size. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 378-86, 2000.

OLALLA, M.; RUIZ-LÓPEZ, M.D.; NAVARRO, M.; ARTACHO, R.; CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, v.113, p. 835-38, 2009.

OLIVEIRA, M. C. P. P. **Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared)**: validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2011. 70 f.

ORDOÑEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, F. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Características gerais do leite e componentes fundamentais. In: _____ **Tecnología de alimentos**. Tradução: Maria Murad. Porto Alegre/RS/Brasil: Artmed, v. 2, p. 13-40, 2005.

PARDO, M. F.; NATALUCCI, C. L. Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n.1, p. 57-60, 2002.

PARK, Y.W. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Ruminant Research**, v.14, p.151-159, 1994.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 88–113, 2007.

PARODI, P. W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 8, p. 813-28, 2007.

PATEL, H. A.; ANEMA, S. G.; HOLROYD, S. E.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Lait**, v. 87, p. 251–268, 2007.

PEREIRA, D. B. C. **Utilização de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida na identificação da adição de leite de vaca ao leite de cabra**. 2003. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2003.

PEREIRA, G. A.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 164-80, 2009.

PESIC, M.; BARAC, M.; VRVIC, M.; RISTIC, N.; MACEJ, O.; STANOJEVIC, S. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. **Food Chemistry**, n.125, p. 1443–1449, 2011a.

PESIC, M. B.; BARAC, M. B.; VRVIC, M. M.; RISTIC, N. M.; MACEJ, O. D.; STANOJEVIC, S. P.; KOSTIC, A. Z. The distribution of major proteins in acid wheys obtained from caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. **International Dairy Journal**, v.21, p.831-838, 2011b.

PERRONE, F.; PAIVA, A. A.; SOUZA, L. M. I.; FARIA, C. S.; PAESE, M. C. S.; AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; DOCK-NASCIMENTO, D. B. Estado nutricional e capacidade funcional na úlcera por pressão em pacientes hospitalizados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 431-38, 2011.

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, v.162, n.3, p.329-33, 2002.

RAMOS, M.; JUAREZ, M. FIL-IDF. **Bulletin**, v. 181, p. 3-9, 1984.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; Lagriffoul, G.; Paccard, P.; Guillet, I.; Chilliard, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v.79, p.57-72, 2008.

RIBEIRO, E. L. A.; RIBEIRO, H. J. S. S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 229-235, 2001

PRENTICE, A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. **Public Health Nutrition**, v. 7, n. 1A, p. 227–243, 2004.

RICHARDS, N. S. P. Segurança alimentar: como prevenir contaminações na indústria. **Foods Ingredients**. São Paulo, n. 15, 2002.

SALEM, S. A.; EL-AGAMY, E. I.; SALAMA, F.A.; ABO-SOLIMAN, N. H. Isolation, molecular and biochemical characterization of goat milk casein and its fractions. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.11, p. 29-39, 2009.

SANTOS, S. F.; BOMFIM, M. A. D.; SILVA, M. M. C.; PEREIRA, L. P. S.; SOUZA NETO, M. A.; GARRUTI, D. S.; SEVERINO, L. S. Efeito da casca de mamona sobre a produção, composição e ácidos graxos do leite de cabra. **Revista arquivos de zootecnia**, v. 60, n. 229, p. 113-122, 2011.

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, 2005. SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo – SP: Livraria Varela, 1996. 180 p.

SLAČANAC, V.; HARDI, J.; PAVLOVIĆ, H.; VUKOVIĆ, D.; ČUTIĆ, V. Inhibitory effect of goat and cow milk fermented by ABT-2 culture (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus*) on the growth of some uropathogenic *E. coli* strains. **Italian Journal of Food Science**, v. 16, p. 227- 237, 2004.

SWAISGOOD, H.E. Chemistry of milk proteins. In: FOX, P.F. (Ed.). **Developments in dairy chemistry**. I. Proteins. New York: Applied Sciences Publishers, p. 1-60, 1982.

TSUDA, H.; SEKINE, K.; USHIDA, Y.; KUHARA, T.; TAKASUKA, N.; IIGO, M.; HAN, B. S.; MOORE, M. A. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. **Mutation Research**, v. 462, p. 227-33, 2000.

URBÁN, G.; PÉREZ, N.; FRESÁN, C.; GONZÁLEZ, C.; VEGA, S.; GUTIÉRREZ, R.; DÍAZ, G. Detección de adulteración com suero de quesería em leches fluidas mexicanas mediante eletroforesis em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Revista de Salud Animal**, v.24, n. 1, p. 60-64, 2002.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A.; Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002a.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A.; Separation and quantification of the major casein fractions by reverse high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. **Journal of Chromatography**, 967, p. 209-218,2002b.

VISSER, S.; JENNESS, R.; MULLIN, R.J. Isolation and characterization of b- and g-casein from horse milk. **Biochemical Journal**, v.203, p.131-139, 1982.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAKALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-35, 2001.

WONG, D. W. S.; CARMIRAND, W. M.; PAVLAT, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 36, n. 8, p. 807-44, 1996.

WU, D.; QIN, J.; LIN, B. Self-assembled epoxy-modified polymer coating on a poly (dimethylsiloxane) microchip for EOF inhibition and biopolymers separation. **Lab Chip**, v. 7, n. 11, p. 1490–1496, 2007.

XU, F.; TOWN, M.; BALLUZ, L. S.; BARTOLLI, W. P.; MURPHY, W.; CHOWNDHURY, P. P.; GARVIN, W. S.; PIERANNUNZI, C.; ZHONG, Y.; SALANDY, S. W.; JONES, C. K.; CRAWFORD, C. A. Surveillance for Certain Health Behaviors Among States and Selected Local Areas - United States, 2010. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 62, n. 1, 2013. 250 p.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-93, 1998.