

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

GISELE NOGUEIRA FOGAÇA

**UTILIZAÇÃO DE ELETROFORESE MICROFLUÍDICA NA
DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE
CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ**

Juiz de Fora
2017

GISELE NOGUEIRA FOGAÇA

**UTILIZAÇÃO DE ELETROFORESE MICROFLUÍDICA NA
DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE
CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados 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
2017

GISELE NOGUEIRA FOGAÇA

**UTILIZAÇÃO DE ELETROFORESE MICROFLUÍDICA NA
DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE
CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Edna Froeder Arcuri

Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos

Marco Antônio Moreira Furtado

Marta Fonseca Martins

FICHA CATALOGRÁFICA

Nogueira Fogaça, Gisele.

UTILIZAÇÃO DE ELETROFORESE MICROFLUÍDICA NA
DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE CRU,
PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ / Gisele Nogueira Fogaça. -- 2017.
71 f.

Orientadora: Marta Fonseca Martins

Coorientadora: 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, 2017.

1. Fraude em Leite. 2. Eletroforese. 3. Lab-on-a-chip. 4.
Qualidade do Leite. I. Fonseca Martins, Marta , orient. II. Siqueira de
Oliveira dos Santos, Alessa, coorient. III. Título.

Dedico aos meus pais, que sempre estiveram comigo nessa caminhada. Sem eles, eu não teria concluído essa fase tão importante na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo!

A Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade concedida para que eu pudesse dar continuidade aos estudos e enfim me tornar mestre.

Ao Convênio Embrapa - Monsanto, financiador do projeto, que possibilitou a realização deste trabalho.

A minha orientadora, Marta Martins, mais uma vez, por ter acreditado no meu potencial e por todos os conselhos dados, principalmente, nas ocasiões mais estressantes e confusas.

A minha co-orientadora, Alessa Siqueira, que mais que isso, se tornou uma pessoa exemplar na minha vida, pelo profissionalismo e pelo caráter.

Aos outros integrantes do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite que contribuíram, de alguma forma, para a conclusão do mestrado.

Aos colegas e companheiros de aula, que juntos, fazíamos tudo parecer mais fácil.

Aos meus pais por todo apoio oferecido durante a minha caminhada acadêmica e mais que isso, na minha formação como pessoa.

À Keli, minha chefe no trabalho, pela compreensão que proporcionou a minha liberação da função nos períodos de aula. E por todos os ensinamentos.

Às minhas colegas de trabalho Rosimar e Carol, que de alguma forma também me ajudaram.

As minhas amigas Daiana Machado e Tatiane Tagliatti, que me ajudaram, me escutaram e tornaram meus dias muito mais divertidos.

Ao Fernando David, pela amizade e pelo companheirismo, que sempre me incentivou para a conclusão do mestrado, mesmo com tantos percalços.

RESUMO

Fraudes em lácteos é um problema do ponto de vista econômico, já que traz prejuízos ao consumidor, e em alguns casos, são caracterizadas como um problema de saúde pública, visto que essas podem reduzir os componentes nutritivos originais do alimento ou mesmo provocar contaminação microbiológica, química ou física. Por este motivo, metodologias que visam a comprovação da autenticidade dos produtos lácteos têm sido desenvolvidas. Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o método *lab-on-a-chip* para a detecção de fraude em leite de vaca pela adição de soro de queijo. Sendo assim, amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó foram adicionadas com soro de queijo, simulando este tipo de fraude, em níveis crescentes 0; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 50% (v/v). Todas as amostras foram submetidas a eletroforese *lab-on-a-chip* e SDS-PAGE com o objetivo de detectar fraude. Os resultados obtidos utilizando as duas metodologias foram satisfatórias quanto a separação e quantificação das proteínas do leite. Somente foi possível detectar a fraude a partir de 1% de adição de soro de queijo para os quatro tipos de leite testados pela técnica *lab-on-a-chip*. Com base nestes resultados, conclui-se que esse método pode ser aplicado como um mecanismo de triagem para a detecção de fraude em leite nas rotinas em laboratórios da indústria. Entretanto ressalta-se que a técnica *lab-on-a-chip* deve ser submetida a um processo de validação de metodologia para que possa ser utilizada na rotina em laboratórios de qualidade do leite.

Palavras-chave: fraude em leite, eletroforese, *lab-on-a-chip*, qualidade do leite.

ABSTRACT

Dairy fraud is a problem from the economic point of view, since it causes harm to the consumer and in some cases is characterized as a public health problem, since these frauds can reduce the original nutritional components of the food or even cause microbiological contamination, chemical or physical. For this reason, methodologies aimed at proving the authenticity of dairy products have been developed. Therefore, this work aimed to evaluate the lab-on-a-chip method for the detection of fraud in cow's milk by the addition of cheese whey. Therefore, samples of raw, pasteurized, UHT and powdered milk were added with cheese whey, simulating this type of fraud, at increasing levels 0; 1; 2.5; 5; 10; 20; 30; 50% (v/v). All samples were submitted to lab-on-a-chip electrophoresis and SDS-PAGE with the aim of detecting fraud. The results obtained using the two methodologies were satisfactory regarding the separation and quantification of milk proteins. It was only possible to detect fraud from 1% addition of cheese whey to the four milk types tested by the lab-on-a-chip technique. Based on these results, it was concluded that this method can be applied as a screening mechanism for the detection of milk fraud in routines in industry laboratories. However, it is emphasized that the lab-on-a-chip technique must be submitted to a methodology validation process so that it can be used routine in milk quality laboratories.

Keywords: milk fraud, electrophoresis, *lab-on-a-chip*, milk quality.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| α - CN | Alfa Caseína |
| α - LA | Alfa Lactoalbumina |
| β - CN | Beta Caseína |
| β - LG | Beta Lactoglobulina |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CMP | Caseinomacropéptido |
| DBO | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| DIPOA | Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal |
| DTT | Ditiotreitol |
| GMP | Glicomacropéptido |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| Ig's | Imunoglobulinas |
| κ - CN | Kappa Caseína |
| kDa | Quilodalton |
| Kg | Quilograma |
| L | Litro |
| LANAGRO | Laboratórios Nacionais Agropecuários |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| Met | Metionina |
| μ L | Microlitro |
| mA | Miliampere |
| NANA | Ninhidrina Ácida ou Ácido Siálico |
| Nm | Nanômetro |
| RIISPOA | Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal |
| SDS | Dodecilsulfato de Sódio |
| TCA | Ácido Tricloroacético |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2.1. COMPOSIÇÃO DO LEITE | 14 |
| 2.2. COMPOSIÇÃO DO SORO DE QUEIJO | 16 |
| 2.3. FRAUDES EM LEITE..... | 19 |
| 2.4. METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE..... | 21 |
| 2.4.1. Eletroforese convencional..... | 22 |
| 2.4.2. Eletroforese <i>lab-on-a-chip</i> ou eletroforese microfluídica | 24 |
| 2.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1. AMOSTRAS DE LEITE E SORO DE QUEIJO | 27 |
| 4.2. PROTEÍNAS-PADRÃO | 28 |
| 4.3. PREPARO DAS SIMULAÇÕES DE FRAUDE NAS AMOSTRAS DE LEITE | 28 |
| 4.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD..... | 29 |
| 4.5. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE FRAUDADAS | 29 |
| 4.6. ELETROFORESE CONVENCIONAL EM SDS-PAGE | 29 |
| 4.6.1. Preparo das amostras | 29 |
| 4.6.2. Corrida eletroforética | 30 |
| 4.6.3. Coloração dos géis | 30 |
| 4.7. ELETROFORESE <i>LAB-ON-A-CHIP</i> | 31 |
| 4.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1. COMPARAÇÃO ENTRE O COMPORTAMENTO DAS PROTEÍNAS DOS LEITES CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ FRAUDADAS COM SORO, PELO MÉTODO ELETROFORÉTICO <i>LAB-ON-A-CHIP</i> | 33 |

| | |
|---|----|
| 5.1.1. Análise quantitativa das amostras de leite cru fraudadas com soro de queijo..... | 34 |
| 5.1.2. Análise quantitativa das amostras de leite pasteurizado fraudadas com soro de queijo | 36 |
| 5.1.3. Análise quantitativa das amostras de leite UHT fraudadas com soro de queijo ... | 39 |
| 5.1.4. Análise quantitativa das amostras de leite em pó fraudadas com soro de queijo . | 41 |
| | |
| 5.2. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS LEITES CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ FRAUDADOS COM SORO DE QUEIJO, PELO MÉTODO ELETROFORÉTICO SDS-PAGE..... | 43 |
| | |
| 5.2.1. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite cru fraudado com soro de queijo | 45 |
| 5.2.2. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite pasteurizado fraudado com soro de queijo | 48 |
| 5.2.3. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite UHT fraudado com soro de queijo | 50 |
| 5.2.4. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite em pó fraudado com soro de queijo | 54 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 59 |
| 7. CONCLUSÃO | 65 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 65 |
| REFERÊNCIAS | 66 |

1. INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro alimento dos mamíferos nos estágios iniciais da vida e as propriedades contidas nele fornecem energia e nutrientes necessários para o crescimento de grande parte dos animais (PRATA & PRATA, 2012). O consumo de produtos lácteos é elevado por todo mundo e esse fato o torna objeto de ações ilícitas que caracterizam fraude e que conseqüentemente, influencia em um controle de qualidade mais exigente (CARVALHO et al., 2007).

O leite antes de chegar ao consumidor passa por vários processos que vão desde a recepção da matéria-prima (leite cru), processamento e transporte até a comercialização nas prateleiras dos mercados. Existe ainda, a produção de leite, normalmente em pequenas propriedades, que é vendido livremente sem nenhum padrão de qualidade. Durante esses passos podem ocorrer eventos que interferem na qualidade e segurança do leite e derivados, na maioria das vezes de forma intencional como a adição de substâncias estranhas para ganhos econômicos, por exemplo (WANDERLEY et al. 2013).

As fraudes de natureza econômica mais comumente praticadas no leite são adição de água, adição de substâncias neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade e adição de soro de queijo (FILHO et al., 2009). Deste modo, o interesse a respeito da autenticidade de produtos lácteos tem aumentado a cada ano, uma vez que o leite fraudado além de perder as suas propriedades físico-químicas, pode também ter a sua microbiota natural comprometida (AQUINO, 2013).

Fraudes com soro de queijo são bastante comuns devido a sua composição ser semelhante a do leite. Além de seu baixo custo é produzido em grande quantidade muitas vezes sem local apropriado para descarte. Deste modo, a incorporação de soro de queijo ao leite é facilitada, mas, no entanto sua detecção é dificultada pelos métodos comuns estabelecidos em legislação (CARVALHO et al., 2007; TULLIO, 2007).

Perante a legislação brasileira, adição de soro de queijo ao leite é considerada fraude (BRASIL, 2017) já que o leite tem suas características originais alteradas e também devido ao fato de que o consumidor não tem acesso a este tipo de informação. Em contrapartida, a instrução normativa nº16, de 23 de agosto de 2005 do MAPA, permite que o soro de queijo seja utilizado como ingrediente para as bebidas lácteas. Contudo, o produto final deve ter em seu rótulo a informação da

quantidade de soro adicionada, considerando que pelo menos 51% do produto final seja composto de base láctea (BRASIL, 2005).

Na tentativa de inibir essas irregularidades, como a adição de soro de queijo de forma inapropriada no leite, é necessária inspeção de forma eficaz por parte dos órgãos fiscalizadores, com a finalidade de garantir a qualidade e segurança do leite, assegurando também a autenticidade dos produtos perante aos consumidores bem como sua saúde (WANDERLEY et al., 2013).

Para isso, muitas metodologias foram desenvolvidas para a detecção de fraudes em leite pela adição de soro de queijo tais como a determinação do ácido siálico também denominado como NANA (WARREN, 1959) e que mais tarde os autores Wolfschoon-Pombo e Pinto (1985) adaptaram tal reagente, que passou a ser chamado de reagente de Erlich; cromatografia líquida de alto desempenho por filtração géllica (CLAE-FG) descrita por Hooydonk e Olieman (1982); eletroforese convencional em gel de poliacrilamida (PAGE) (VILELA, 1987); CLAE em coluna de fase reversa (CLAE-FR) (OLIEMAN; RIEL, 1989); eletroforese convencional com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), métodos imunológicos e moleculares, entre outros tipos de cromatografias (GALINDO-AMAYA; VALBUENA-COLMENARES; ROJAS-VILLAROEL, 2006; TULLIO, 2007; ROJAS et al., 2009; MARQUES et al., 2011).

Uma nova técnica tem sido utilizada em alguns estudos para a separação e quantificação de proteínas, a chamada eletroforese capilar microfluídica ou *lab-on-a-chip*. Esse método tem sido recomendado por fornecer bons resultados, otimização do tempo de análise e preparo de amostras, pequeno consumo de reagentes e um limite de detecção na ordem de nanogramas de proteínas em microlitros (μL) de amostras. Muitas pesquisas têm demonstrado resultados satisfatórios ao avaliar perfil protéico do leite com o uso dessa metodologia (ANEMA, 2009; BUFFONI et al., 2011; COSTA, 2014; MEURER; 2014).

Deste modo, o método *lab-on-a-chip* pode ser adotado como uma técnica alternativa a técnica convencional SDS-PAGE como uma forma de triagem para a identificação de fraude em leite pela adição de soro de queijo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o método *lab-on-a-chip* para detectar fraude em leite de vaca pela adição de soro de queijo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. COMPOSIÇÃO DO LEITE

Grande parte do leite é constituída por água e, conforme a espécie de mamífero, ocorrem variações nas quantidades de lipídios, proteínas e carboidratos, os quais são produzidos nas glândulas mamárias. Demais componentes como minerais e outros compostos solúveis, são produzidos diretamente do plasma sanguíneo (PELLEGRINI et al., 2012).

O leite de vaca é constituído por aproximadamente 87% de água e 13% de compostos sólidos, sendo 3,9% representados pelos lipídios; 3,4% proteínas; 4,8% lactose e vitaminas e somente 0,8% correspondente aos minerais. Esses componentes conferem ao leite elevado valor nutricional e são determinantes nas características de cor e sabor, além de exercerem influência na fabricação de queijos, manteigas, iogurtes e demais derivados (REIS et al., 2012).

A Instrução Normativa (IN) nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define leite como:

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que procede. (BRASIL, 2011).

Dentre esses componentes, as proteínas são consideradas como elementos principais que caracterizam o leite de vaca. Basicamente, existem duas classes: proteínas do soro, correspondendo a 20% do total de proteínas; e as caseínas, sendo seis tipos conhecidos α_1 – alfa s1, α_2 – alfa s2, β – beta, γ – gama, κ – kappa e λ – lambda correspondentes a 80% do total (GALINDO-AMAYA; VALBUENA-COLMENARES; ROJAS-VILLARROEL, 2006).

Aproximadamente 50% das caseínas do leite compõem o grupo das alfa-caseínas (α -CN), 30% o de beta-caseína (β -CN) e 15% de kappa-caseína (κ -CN). Já a fração proteica do soro contém aproximadamente 50% de beta-lactoglobulina (β -LG), 25% de alfa-lactoalbumina (α -LA) e os outros 25% de outras proteínas como albumina do soro bovino (BSA), lactoferrinas, imunoglobulinas (Ig's) (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012), caseínomacropéptideo (CMP), que é formado a partir da

hidrólise da κ -CN. (MARQUES et al., 2011) e é um indicador de fraude em leite pela adição de soro de queijo (BRASIL, 2006) entre outras.

As duas classes de proteínas são diferentes química e fisicamente. As soroproteínas são proteínas menores quando comparadas às caseínas, sua estrutura é globular, compactas, solúveis em várias faixas de pH, termolábeis e não coaguláveis pela renina (BOSCHI, 2006). Já as caseínas são fosfoproteínas que conseguem manter a sua estabilidade quando ligadas a moléculas de cálcio (MARQUES et al., 2011). Em sua forma nativa, essas proteínas se agregam em estruturas termodinamicamente estáveis que são chamadas de micelas. Nestas micelas, na porção hidrofóbica ficam as caseínas sensíveis ao cálcio e àquelas insensíveis a esse mineral permanecem na parte hidrofílica; esse fato é responsável pela estabilidade físico-química das micelas (RASMUSSEN et al., 1999).

O papel das micelas de caseínas é sequestrar partículas de fosfato de cálcio no leite, e por este motivo, a principal fonte desse mineral na alimentação de recém-nascidos é o leite. O deslocamento do fosfato de cálcio entre as micelas está envolvido nos processos de mineralização dos ossos quanto no controle da concentração de cálcio e fosfato no leite, o que evita a calcificação das glândulas mamárias (HOLT et al., 2013).

Do ponto de vista econômico, as caseínas são as mais relevantes devido ao seu alto valor nutritivo e suas características físico-químicas que influenciam diretamente na fabricação diversos derivados do leite (HUPPERTZ et al., 2006; REIS et al., 2012). Acredita-se que o processamento do leite em altas temperaturas só é possível graças a essas proteínas, especificamente, visto que elas permanecem estáveis quando submetidas ao calor (FOX e McSWEENEY, 1998).

De um modo geral, o papel nutricional de proteínas nos alimentos frequentemente é estudado. Pesquisas sobre o uso de proteínas como ingredientes funcionais é bastante difundido, como pode ser visto em produtos lácteos comerciais entre outros alimentos que destacam o apelo funcional, que se fundamenta na utilização de peptídeos bioativos oriundos das proteínas do leite. Ao empregar as proteínas como propulsoras funcionais, torna-se viável para as indústrias o desenvolvimento de novos produtos com atributos específicos, agregando valor a subprodutos, como por exemplo, o soro de queijo, o qual muitas vezes representa um problema para o setor industrial (OLIVEIRA; BRAVO e TONIAL, 2012).

Além disso, proteínas são muito utilizadas como indicadoras da legitimidade do leite e derivados por meio de métodos de análise que visam a separação e quantificação de proteínas como a eletroforese e outras como cromatografia, espectrofotometria e ensaios imunológicos (MAGENIS, 2015). A adição de soro de queijo ao leite, por exemplo, pode ser detectada pela presença de suas proteínas específicas de forma evidenciada em um gel de eletroforese, pela identificação do CMP por cromatografia ou ainda por características físico-químicas típicas do soro e até mesmo por alterações de cor, odor e sabor.

2.2. COMPOSIÇÃO DO SORO DE QUEIJO

O soro de queijo é um subproduto aquoso verde-amarelado proveniente da fabricação de queijos sendo produzido a partir da coagulação enzimática ou ácida do leite. Conforme o tipo de coagulação podem ser gerados o soro doce que é oriundo da coagulação enzimática e o soro ácido, o qual se dá a partir da coagulação ácida do leite (TULLIO, 2007).

A composição e o tipo de soro varia de acordo com o queijo que é fabricado, além de depender da técnica utilizada para o processamento, o que acarreta em diversas mudanças nos teores de proteína, gordura e minerais (AQUINO, 2013). O soro de queijo é composto por aproximadamente 93% de água e os 7% restantes corresponde a matéria seca representada pela lactose, proteínas, gordura e sais minerais.

O soro de queijo contém alto valor nutricional que é atribuído, principalmente, as proteínas que possuem aminoácidos essenciais. Estas proteínas apresentam importantes propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes e cápsulas protetoras, além de fazerem parte de um grupo proteico diversificado com características estruturais bastante diversificadas (SGARBIERI, 2005). No quadro 1 estão listadas as principais proteínas do soro.

Quadro 1 – Distribuição das principais proteínas presentes no soro de queijo oriundo da fabricação de queijos a partir de leite bovino

| Proteínas do soro | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| β -Lactoglobulina (β -LG) | 3,2 |
| α -Lactoalbumina (α -LA) | 1,2 |
| Albumina sérica bovina (BSA) | 0,4 |
| Imunoglobulinas (Ig's) | 0,7 |
| Lactoferrina | 0,1 |
| Lisozima | Desprezível |
| Proteínas totais | 5,6 |

Fonte: Sgarbieri (2005). Adaptado.

No leite de vaca as proteínas α -LA e β -LG são as principais sendo, esta última, a mais abundante. A β -LG tem 162 aminoácidos, sua função é definida pela estrutura primária e tem peso molecular que varia entre 18 kDa e 36 kDa. É sensível em pH ácido e altas temperaturas e é absorvida no intestino delgado por apresentar resistência a acidez e enzimas estomacais. Os peptídeos derivados desta proteína estão envolvidos nas ações do organismo anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, imunoestimulante e hipocolesterolêmico (ALMEIDA et al., 2013). No entanto, a β -LG, pode provocar alergias naqueles indivíduos considerados mais sensíveis, como por exemplo, crianças (SGARBIERI, 2005).

A α -LA com 123 aminoácidos tem peso molecular de 14 kDa e é rica em aminoácidos essenciais como o triptofano, precursor de uma importante vitamina para o metabolismo celular. Seus peptídeos derivados desempenham funções biológicas anticancerígenas, antimicrobianas contra bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (ALMEIDA et al., 2013).

A BSA, um polipeptídeo com cerca de 582 aminoácidos e aproximadamente 66 kDa, pode-se ligar quimicamente a moléculas de ácidos graxos livres e outros lipídeos facilitando seu transporte na corrente sanguínea atuando ativamente nas funções fisiológicas e funcionais (ALMEIDA et al., 2013).

As Ig's têm alto peso molecular variando entre 150 a 1000 kDa e estão envolvidas com funções do sistema imune protegendo contra infecções. Quatro das cinco classes das Ig's se encontram no leite bovino: IgG, IgA, IgM e IgE, sendo que a IgG representa 80% do total. As Ig's têm bom desempenho praticamente em todos os sistemas do organismo e atuam em atividades da imunidade passiva e têm poder antioxidante. Estão relacionadas também com o estímulo da apoptose de células tumorais (SGARBIERI, 2004; ALMEIDA et al., 2013).

A lactoferrina de peso molecular 78-80 kDa é formada por 689 aminoácidos. Esta proteína pode inibir a proliferação e o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e também de leveduras, fungos e protozoários, pois ela é capaz de obter o ferro livre do ambiente. (SGARBIERI, 2004; ALMEIDA et al., 2013).

No caso do soro doce, originado da coagulação enzimática do leite, além destas proteínas existe ainda um macropeptídeo chamado de caseinomacropeptídeo (CMP), o qual é produzido pela hidrólise de uma caseína, a κ -CN. Devido a esse motivo, não é considerada como uma proteína do soro especificamente, já que o CMP tem origem a partir da quebra de uma proteína do leite (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006).

O CMP, porém, não é formado exclusivamente pela coagulação enzimática, pois pode ser originado a partir de microrganismos psicotróficos, que produzem uma enzima que é capaz de hidrolisar a κ -CN. Isso é um ponto negativo para a detecção de fraudes pela adição de soro de queijo, pois os resultados das análises podem ter influência da ação desses microrganismos e não necessariamente, significa que o leite foi fraudado com soro de queijo (OLIVEIRA et al., 2009).

O soro de queijo é produzido em grande quantidade. Por exemplo, para a produção de 1 Kg de queijo são necessários em média 10 L de leite, claro que levando em consideração uma série de outros fatores como a qualidade do leite recebido bem como o tipo de queijo que será fabricado. Essa grande quantidade de soro gerada e devido sua composição ser muito semelhante a do leite, podem implicar em práticas ilícitas como a sua adição de forma inadequada no leite, visando o aumento de volume o que caracteriza fraude econômica, uma vez que lesa o consumidor por este adquirir um produto com as características originais alteradas (CARVALHO, 2007). Ou ainda, em muitos laticínios, o soro é descartado junto com os outros efluentes gerados na fabricação de produtos lácteos, o que agrava o potencial poluidor dessa substância (SILVA, 2011).

Como cerca de 90 a 95% do volume de leite que é destinado para a produção de queijos resulta em soro, isto representa um fator relevante para que medidas alternativas para o uso do soro sejam viabilizadas. Uma das formas para o descarte é o tratamento do efluente antes do seu retorno para o meio ambiente, o qual é feito em estações de tratamento (ETEs) instaladas na área das próprias indústrias laticinistas; ou ainda, ser armazenado separadamente em tanques a fim de aproveitá-lo na fabricação de outros produtos lácteos, fornecê-lo para outras

empresas que o utilizam como matéria-prima na fabricação de diversos alimentos entre outras aplicações (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012).

2.3. FRAUDES EM LEITE

A legislação brasileira por meio do RIISPOA em seu artigo nº 504, considera fraudados as matérias-primas ou os produtos de origem animal que apresentem adulterações ou falsificações, sendo que as definições para esses dois conceitos são diferentes (BRASIL, 2017)

As adulterações são definidas como: matérias-primas ou produtos que tenham perdido suas características originais devido a substituição por componentes estranhos que não estão dispostos em legislação específica; adição de ingredientes ou qualquer outra substância visando mascarar outras alterações, má qualidade da matéria-prima, deficiência na fabricação ou aumentar o volume ou o peso do produto com o objetivo de benefício próprio; produtos que na manipulação ou na fabricação tenham sido empregados matérias-primas ou ingredientes impróprios ou que não cumpram ao disposto nas legislações específicas de determinado produto; os produtos em que tenham sido adicionados ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia diferentes daqueles expressos na formulação original ou sem autorização do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA); ou os produtos que com alterações na data de fabricação e no prazo de validade (BRASIL, 2017).

Já as definições para falsificação são: qualquer produto que tenha sido utilizado nomes diferentes dos previstos no RIISPOA, em normas complementares ou no registro de produtos junto ao DIPOA; produtos que tenham sido elaborados, fracionados ou reembalados, expostos ou não ao consumo, com a aparência e as características gerais de um outro produto registrado junto ao DIPOA e que tenha o nome deste, mesmo não o sendo; quando o rótulo do produto contenha informações que gere confusão ao entendimento do consumidor ou ainda que lhe seja atribuído informações de cunho terapêutico; produtos que tenham sido elaborados a partir de espécie diferente daquela informada no rótulo ou diferente da especificada no registro do produto; ou ainda produtos que não tenham sido processados conforme

descrito no seu registro, expostos ou não ao consumo, mas que estejam indicados como um produto processado (BRASIL, 2017).

De todo modo, em ambos os casos seja ela adulteração ou falsificação dos produtos de origem animal, estão previstas penalidades uma vez que essas práticas lesam o consumidor (BRASIL, 2017).

Na indústria do leite, a prática de fraudar ocorre em qualquer etapa da cadeia da produção leiteira, que vai desde a ordenha até o beneficiamento, já na indústria, podendo ser feita por meio da adição de substâncias que se misturam ao conteúdo principal e são difíceis de detectar, normalmente realizadas pelos produtores de leite, transportadores ou mesmo funcionários de laticínios (MAGALHÃES, 2008).

A fraude de leite fluido de natureza econômica é a mais comum, sendo feita através da incorporação de água ou outras substâncias, como neutralizantes de acidez, reconstituintes de densidade e adição de soro de queijo (FILHO et al., 2009).

A ação fraudulenta por meio da adição de água ocorre para aumentar o volume do leite. Inconsistências entre o ponto de congelamento e a densidade do leite são indícios desse método. Quando a fraude é realizada na indústria, ela é bem mais precisa e as alterações são difíceis de serem percebidas. A fraude por adição de água também prejudica a qualidade microbiológica do leite, visto que a maioria dos fraudadores utiliza água não tratada, além de reduzir de forma significativa o valor nutricional do produto (ABRANTES et al., 2014).

Outras substâncias também são comumente adicionadas para aumentar o volume do leite, como por exemplo, soro de queijo. Devido ao baixo custo dos soros e por ser um meio de aproveitar tal resíduo proveniente da indústria queijeira, esse tipo de fraude tornou-se viável visto que é economicamente atrativa para muitas empresas. Esta ação ocasiona uma concorrência mercadológica desleal, lesando as empresas que atuam corretamente, bem como o consumidor. Tal prática ainda é difícil de ser controlada pelos órgãos responsáveis, muitas vezes em função da ausência de métodos de análise capazes de detectar a fraude em tempo hábil (CARVALHO et al, 2007; MAGALHÃES, 2008).

A adição de soro de queijo ao leite tem sido o foco de muitos pesquisadores desde há pelo menos 20 anos. Com isso, diversas metodologias já foram desenvolvidas para a detecção desse tipo de ação fraudulenta, como determinação do ácido siálico, método de determinação de ninhidrina ácida, determinação do índice de índice caseinomacropéptideo (CMP) por CLAE entre outras. No Brasil, a

Instrução Normativa nº 7/2010, determina como método oficial para a rede de Laboratórios do MAPA (LANAGROS), a pesquisa de CMP utilizando eletroforese capilar e HPLC seguidos de espectrometria de massas (BRASIL, 2010). E a Instrução Normativa nº 68/2006 também oficializa a técnica CLAE para a detecção de fraude por adição de soro de queijo com base no índice de CMP. Contudo, são metodologias que exigem alto investimento financeiro, analistas capacitados e tempo para a realização das análises, tornando difícil o alcance aos resultados.

Todavia, as formas para adulteração do leite ainda são problemas muito frequentes. Isto se deve a capacitação dos fraudadores que conseguem desenvolver formas modernas de adulteração que estão fora dos limites de detecção empregados com as metodologias existentes (AQUINO, 2013).

2.4. METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE

Diversas metodologias para detecção de fraudes em leite tem fundamento na separação e quantificação de proteínas e são importantes para o controle da qualidade e segurança do leite e seus derivados. O método oficial estabelecido pelo ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é baseada na quantificação do CMP (BRASIL, 2006).

Contudo, os resultados podem ser falso positivos, visto que o CMP também pode ser proveniente da ação de microrganismos psicotróficos, os quais são capazes de produzir uma enzima que hidrolisa a κ -CN, reação esta que ocorre naturalmente nessa proteína na produção de queijos (OLIVEIRA et al., 2009).

Ainda assim a separação e quantificação das proteínas do leite de vaca representam um fator de extrema importância para pesquisas que envolvem leite e derivados. Em muitos estudos, o reconhecimento e a nomenclatura dessas proteínas, na prática laboratorial, são baseadas principalmente na sua separação por técnicas eletroforéticas. Eletroforese em gel de poliacrilamida em determinadas condições, como na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) é uma técnica eficaz para a separação, detecção e quantificação das frações de proteínas existentes no leite (ANEMA, 2009).

Nos últimos anos, uma inovação que tem fundamento na técnica de eletroforese similar ao SDS-PAGE, a chamada eletroforese microfluídica em *chip* ou

lab-on-a-chip, tem sido útil para a separação e quantificação de proteínas, sendo utilizada para avaliar o perfil proteico do leite (ANEMA, 2009; MEURER, 2014).

Outras metodologias como eletroforese capilar, método espectrofotométrico, ensaios imunológicos e reação em cadeia da polimerase, do termo em inglês *polymerase chain reaction* (PCR) são bastante utilizadas para a detecção de fraudes em leite, até mesmo aquelas originadas pela adição de leite de outras espécies. Bons resultados têm sido observados além de uma boa correlação entre essas metodologias, quando comparadas. Todavia, cada método tem as suas particularidades que oferecem vantagens e desvantagens e nenhum deles, se aplicado sozinho, é capaz de permitir informações completas sobre as proteínas do leite (ANEMA, 2009; PATEL et al., 2007).

Anema (2009) em seu estudo com a metodologia *lab-on-a-chip* onde avaliou o perfil proteico do leite, apontou diversas vantagens da técnica: tempo de análise, quantidade de amostra e reagente, tempo de preparação das amostras e índice de toxicidade de reagente quase que inexistente. Essas vantagens oferecem ao método uma possibilidade de ser utilizado como alternativo e/ou complementar a metodologia oficial do MAPA na detecção de fraude em leite.

2.4.1. Eletroforese convencional

O uso da eletroforese é muito comum para o fracionamento e caracterização de aminoácidos, peptídeos, proteínas (incluindo lipoproteína e glicoproteína) e outras substâncias com importância biológica que apresentam cargas em função ao pH do meio (SILVA JÚNIOR, 2001). Para proteínas, esta técnica é empregada como um método analítico eficaz, pois em uma mistura qualquer, por exemplo, é possível separar proteínas pelo seu peso molecular, determinar o ponto isoelétrico e ainda, fazer uma análise qualitativa a partir da imagem do gel reproduzida em um computador (NELSON; COX, 2004).

As primeiras eletroforeses em gel de poliacrilamida eram com o uso de um tipo de gel somente, o chamado gel fracionador ou de separação ou ainda gel de poro pequeno. Mais tarde, introduziu-se o gel de concentração ou também chamado de gel de poro largo ou ainda gel de empilhamento que antecedia o gel fracionador. A partir daí, surgiu o sistema descontínuo nas eletroforeses em gel de poliacrilamida

para proteínas, onde se inseriu descontinuidades na porosidade dos géis, na composição química e no pH das soluções-tampão constituintes de cada gel, no pH da solução-tampão existente no catodo e anodo bem como na sua composição. Esse processo é feito através da base orgânica Tris (Trihidroximetil-aminometano) que se apresenta sob a forma de Tris-HCl nas soluções-tampão dos géis e na forma de Tris-Glicina nos compartimentos dos eletrodos (SILVA JÚNIOR, 2001).

Todo esse sistema de eletroforese baseada na diferença de potencial entre os eletrodos pode ainda ser usado em técnicas nativas (sem desnaturantes) as quais separam por peso, carga e forma das macromoléculas; e desnaturantes, com uso de SDS, utilizando agentes redutores ou não, onde a separação ocorre essencialmente pelo peso molecular (SILVA JÚNIOR, 2001). A eletroforese em gel de poliacrilamida associada ao SDS é uma técnica muito usada para análise de proteínas. O gel é uma matriz composta de um polímero de acrilamida de ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, a qual permite escolher o tamanho dos poros de acordo com a concentração de acrilamida. Isto é, quanto mais concentrada a acrilamida no meio, menores serão os poros da malha formada (ROCHA et al., 2005).

Anteriormente à corrida eletroforética desnaturante em SDS-PAGE é necessário que a forma e a carga nativa das proteínas sejam eliminadas. Isso acontece para que a separação durante a corrida aconteça preferencialmente em função da massa molecular e para tal, as proteínas são tratadas com SDS. A função principal do SDS é normalizar a carga e o formato das proteínas, ou seja, ocorre a desnaturação onde a estrutura das proteínas – normalmente globular – passa a ser uma estrutura linear que possui densidade de carga uniforme. Além desse tratamento com SDS, as proteínas podem ser associadas a agentes redutores, como ditioneitol (DTT) e 2-Mercaptoetanol, que quebram as ligações por pontes dissulfeto auxiliando na eliminação da estrutura tridimensional das proteínas (SILVA JÚNIOR, 2001; ROCHA et al., 2005).

Posteriormente ao tratamento das proteínas, elas são aplicadas nos poços delimitados do gel e então são submetidas a corrente elétrica. As proteínas se deslocam pela malha do gel do polo negativo para o positivo. Levando em consideração o tamanho das proteínas, as menores migram mais rápido do que as maiores. Há necessidade de utilizar padrões proteicos de pesos moleculares já conhecidos para obter o valor do peso molecular das proteínas de interesse (SILVA JÚNIOR, 2001; ROCHA et al., 2005).

2.4.2. Eletroforese *lab-on-a chip* ou eletroforese microfluídica

O método de eletroforese microfluídica ou ainda chamada de técnica microfluídica *lab-on-a-chip* é uma eletroforese em SDS-PAGE, mas que, no entanto é feita em *chips* próprios e realizada em equipamentos específicos. Neste trabalho foi utilizado o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha*). O mecanismo de funcionamento para as proteínas se baseia na sua detecção conforme o seu peso molecular por fluorescência induzida por um *laser*, do inglês, *laser-induced fluorescence* (LIF) que acontece durante a corrida eletroforética. A intensidade de fluorescência nas proteínas são medidas em função do tempo de suas migrações (NITSCHKE, 2011).

É uma técnica recente para a separação e quantificação de proteínas bem como DNA e RNA. Estudos demonstraram o uso desse método na análise das proteínas do leite e derivados, inclusive com o intuito de identificar fraude no leite oriunda da adição de leite de outras espécies (WU, QIN e LIN, 2008; NITSCHKE, 2011).

Esta metodologia traça perfis proteicos com auxílio de kits próprios, fornecidos pelo mesmo fabricante, *Agilent*. No caso de proteínas, há dois kits existentes: *Agilent Protein 80* kit, que é capaz de detectar proteínas com massa molecular de 5-80 kDa; e *Agilent Protein 230* kit, que determina proteínas com peso molecular de 14-230 kDa. Para o perfil proteico do leite, utiliza-se o *Agilent Protein 80* kit, já que as massas moleculares das principais proteínas do leite estão dentro deste intervalo (GARCÍA-OTERO et al., 2013).

O *Agilent Protein 80* kit tem os seguintes componentes: *chips* de proteínas com microcanais que funcionam como peneiras (seleção) para detectar proteínas dentro da faixa 5-80 kDa; *Protein 80 Gel-Matrix* e *Protein 80 Dye Concentrate*, utilizados no preenchimento dos *chips* antes da inserção das amostras; tampão de amostra, que é usado para o preparo da solução de desnaturação e *Protein 80 Ladder* que é o padrão de peso molecular de proteínas nas faixas 6,5; 15; 28; 46 e 63 kDa. As referentes massas moleculares das proteínas, concentrações, área total da proteína, tempo de migração dentre outros índices são detectados automaticamente pelo programa *Agilent 2100 Expert* por meio de cálculos matemáticos e algoritmos, que acontecem à medida que as amostras vão sendo detectadas e lidas pelo sistema. Para determinação das massas moleculares, o

tempo de retenção (R_f) das proteínas é comparado com os tempos de retenção do *Ladder* (NITSCHÉ, 2011; GARCÍA-OTERO et al., 2013).

A eletroforese microfluídica oferece vantagens sobre a técnica de eletroforese convencional. A corrida eletroforética, com um total de 10 amostras por *chip*, ocorre em não mais que 40 minutos, tempo muito inferior quando comparado ao tempo necessário à eletroforese convencional que demora de 2 a 3 horas. Faz uso de pequeno volume de amostras e de reagentes; além disso, os níveis de toxicidade dos reagentes são baixos em relação àqueles utilizados na técnica tradicional (ANEMA, 2009; NITSCHÉ, 2011; GARCÍA-OTERO et al., 2013).

A técnica *lab-on-a-chip*, em amostras de leite, foi utilizada para obtenção do perfil proteico e já foram determinados os pesos das principais proteínas, porém os trabalhos realizados não são muito detalhados (ANEMA, 2009). Meurer (2014) em seu estudo onde avaliou amostras de leite com simulações de fraude pela adição de leite de vaca ao leite de cabra, o método *lab-on-a-chip* foi capaz de detectar a fraude a partir de 20% de adição de leite de vaca, demonstrado pelo comportamento da α -CN s1 bovina.

Como não há relatos na literatura sobre o uso desta técnica para identificar fraude no leite pela adição de soro de queijo, neste trabalho esta metodologia foi utilizada com esta finalidade.

2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica analítica de grande impacto devido a sua sensibilidade e uma ampla gama de aplicações, sendo possível utilizá-la no controle de qualidade de rotinas industriais e até mesmo pesquisas mais detalhadas (CHUST, 1990).

É baseada na separação de componentes químicos presentes em um meio, ou seja, em uma amostra também chamada de soluto. Tal separação se dá por um processo de interação seletiva entre as moléculas do soluto e duas fases da metodologia denominadas estacionária e móvel (CHUST, 1990).

A fase estacionária trata-se da coluna cromatográfica que nada mais é que um cilindro rígido feito de aço ou vidro. Já a fase móvel ou solvente que flui através do sistema, conduzindo a amostra injetada pela coluna e pelo detector. A composição química de uma amostra dispõe de diferentes graus de afinidade com

as fases móvel e estacionária influenciando assim nas velocidades de migração, o que resulta na separação cromatográfica (CHUST, 1990).

Ainda de acordo com Chust (1990) existem vários tipos de CLAEs que são definidas basicamente pelo mecanismo de separação, que por sua vez, depende do tipo de amostra que será analisada além do objetivo da mesma. Os principais mecanismos e suas respectivas aplicações estão descritas a seguir:

- a) Cromatografia de adsorção: separação de vitaminas lipossolúveis (A, D e E), ftalatos, fenóis, aflatoxinas, anilinas entre outras;
- b) Cromatografia de fase reversa (partilha): vitaminas incluindo as lipossolúveis, aminoácidos, proteínas, drogas terapêuticas, fenóis, alcaloides, ácidos graxos livres, carboidratos, compostos aromáticos, nucleotídeos etc;
- c) Cromatografia de permeação em gel: proteínas, polímeros e resinas;
- d) Cromatografia de interação hidrofóbica: quase que exclusivamente utilizada para separação de proteínas;
- e) Cromatografia de interação iônica: cátions e ânions inorgânicos incluindo os metais de transição.

Para a indústria de leite e derivados a cromatografia é considerada uma grande ferramenta para averiguar a autenticidade desses produtos, sendo a análise cromatográfica baseada na separação de proteínas que inclui os tipos de fase reversa, troca de íons, interação hidrofóbica e cromatografia de exclusão (MOORE, et al., 2010).

Embora a CLAE seja eficiente para separar e quantificar as proteínas de alimentos em geral, auxiliando na verificação da autenticidade dos produtos alimentícios, a técnica oferece muitas limitações principalmente quando o objetivo de seu uso é a aplicação na rotina industrial. Além do tempo de análise ser demorado, o método requer diversos tipos de solventes tóxicos que são indispensáveis para a fase móvel e também ao preparo da matriz alimentar onde é preciso realizar o isolamento das proteínas de interesse. Associado a isso, o custo do equipamento é bastante elevado não sendo acessível a maioria das indústrias do setor de alimentos (MOORE, et al., 2010).

Outras metodologias vêm sendo empregadas para a detecção de fraude em leite, como o uso de PCR, no entanto esta técnica é eficaz para identificação de

fraudes a partir de misturas de leite de espécies de animais diferentes. Esta metodologia é rápida e com bom limite de detecção, porém é preciso investimento alto e a necessidade de regulamentação pelos órgãos oficiais (MALORNY et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o método *lab-on-a-chip* para a detecção de fraude em leite de vaca pela adição de soro de queijo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento das principais proteínas do leite α , β e κ caseínas bem como das proteínas do soro β -LG e α -LA com a aplicação da metodologia *lab-on-a-chip*, utilizando amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e leite em pó;
- Detectar fraude a partir da avaliação das proteínas dos leites cru, pasteurizado, UHT e em pó nas condições empregadas;
- Utilizar a técnica *lab-on-a-chip* como método de triagem para auxiliar a identificação de fraude em leite pela adição de queijo em leite;
- Comparar a técnica *lab-on-a-chip* com a eletroforese SDS-PAGE na separação e quantificação das proteínas do leite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS DE LEITE E DE SORO DE QUEIJO

Foram utilizadas amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó e soro de queijo. As amostras de leite cru foram coletadas no Campo Experimental José

Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco, Minas Gerais. Já as amostras comerciais (leite pasteurizado, UHT e em pó) foram adquiridas em estabelecimento comercial de Juiz de Fora-MG, sendo que para as amostras de leite UHT e em pó são da marca A e o leite pasteurizado da marca B. O leite em pó foi reconstituído da seguinte maneira: 130 g de leite em pó integral em 900 mL de água ultrapura levemente aquecida; essa solução foi homogeneizada em chapa aquecedora. O soro de queijo foi obtido da produção de queijo a partir do leite cru no Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

4.2. PROTEÍNAS-PADRÃO

As proteínas-padrão utilizadas alfa-caseína (α -CN), beta-caseína (β -CN), kappa-caseína (κ -CN), beta-lactoglobulina (β -LG) e alfa-lactoalbumina (α -LA) foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, EUA). Essas proteínas individualmente foram diluídas em água ultrapura ficando com concentração final de 10 mg/mL. Posteriormente foi preparada um mix de proteínas-padrão contendo todas as proteínas a uma concentração final de 1 mg/mL cada, para serem utilizadas como padrão nas corridas eletroforéticas.

4.3. PREPARO DAS SIMULAÇÕES DE FRAUDE NAS AMOSTRAS DE LEITE

As amostras com simulação de fraude (v/v) dos diferentes tipos de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó foram preparadas com adição de soro de queijo em níveis crescentes (0; 1; 2,5; 5;10; 20; 30; 50%), sendo que 100% é o soro puro. Logo em seguida, essas amostras foram armazenadas e mantidas em temperatura -80 C° até o uso para as análises posteriores.

4.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD

A concentração de proteínas totais das amostras de leite com simulações de adulteração foi determinada pelo Método do Reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Lisboa, Portugal) conforme recomendações do fornecedor e quantificado utilizando o modo “Bradford Protein” no software do espectrofotômetro NanodropTM1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA).

A curva padrão foi elaborada com a proteína soro albumina bovina (BSA) (Sigma®Aldrich, MO, EUA) que foi diluída em água ultrapura entre os intervalos 0; 0,2; 0,4; 0,6; 1,5 e 2,0 mg/mL.

4.5. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE FRAUDADAS

Cada amostra adulterada dos diferentes tipos de leite foi purificada em acetona. Foram diluídos 200 µL de amostra em 600 µL de acetona gelada e em seguida, essas diluições foram armazenadas a -20°C por 2 h. Após esse período de tempo, foi centrifugada a 20.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi completamente seco em temperatura ambiente. O pelete foi ressuspenso em 200 µL de solução tampão Bis-Tris Propano Ureia 7M, homogeneizado por vórtex e mantido a 4°C por no mínimo 15 h. Em seguida, essas amostras foram novamente homogeneizadas no vórtex e mantidas a -20°C até o uso (Manual GE Healthcare, 2D Electrophoresis, 2004).

4.6. ELETROFORESE CONVENCIONAL EM SDS-PAGE

4.6.1. Preparo das amostras

As amostras purificadas em acetona foram descongeladas e homogeneizadas por vórtex por 15 s. Foi feita a diluição na proporção 1:9 em água ultrapura em cada amostra. Para a separação das proteínas, essas diluições foram preparadas na proporção 1:1 em tampão SDS 2X (Tris-HCl pH 6,8 0,5 M; SDS 10%; glicerol 99,9%,

azul de bromofenol 0,5% e 310 mg de ditioneitol–DTT 1 M), homogeneizadas e aquecidas a 95°C por 5 min. e mantidas no gelo até a aplicação no gel.

O tampão de corrida *Amersham ECL Gel 10X* (*GE Healthcare Life Sciences, Bjorkgatan, Uppsala, Suécia*) foi diluído na proporção 1:10 em água destilada, de acordo com as instruções do fabricante.

Como padrão de peso molecular foi utilizado o *NovexProtein* com intervalo entre 3.5 - 260 kDa (*Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Life Technologies – Carlsbad, CA*) e um mix das proteínas-padrão (α -LA, β -LG, α -CN, β -CN e κ -CN) de modo que a concentração de cada proteína foi de 1mg/mL.

4.6.2. Corrida eletroforética

O sistema de eletroforese utilizado foi o tipo horizontal no suporte *Amersham ECL Box* (*GE Healthcare Life Sciences, Bjorkgatan, Uppsala, Suécia*). Os géis com concentração de SDS 12% são do mesmo fornecedor e já são prontos para o uso não tendo a necessidade de prepará-los. Inicialmente, foi realizada uma pré-corrida em gel de 15 poços durante 12 min. a 160 volts. Após esse tempo, as amostras preparadas foram aplicadas no gel seguindo as instruções do fabricante. A corrida eletroforética foi feita a 140 volts por 90 minutos.

4.6.3. Coloração dos géis

Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. A solução corante a base de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Rockford, IL*) foi preparada na diluição de 0,2% (m/v) em etanol absoluto. Após a completa diluição do corante, foram adicionados a mistura, 4 g de ácido tricloroacético (TCA) em 100 mL. Posteriormente, depois de total dissolução de TCA, completou-se a solução com água destilada para um volume final de 200 mL.

Os géis ficaram imersos na solução corante por pelo menos 15 h. Em seguida, fez-se a lavagem em água destilada para retirada do excesso de corante e então foram colocados em solução descorante contendo 80 mL de ácido acético PA, 250 mL de etanol absoluto inferindo em um volume final de 1 L, completado com

água destilada. Os géis permaneceram nessa solução por tempo suficiente até que fossem totalmente descorados. Os géis foram secos (colocados em papel celofane transparente), escaneados e analisados pelo software *ImageQuanTL* (*GE Healthcare Life Sciences, Björkgatan, Uppsala, Suécia*).

4.7. ELETROFORESE LAB-ON-A-CHIP

Todas as amostras com simulação de fraude foram submetidas à eletroforese microfluídica no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* com uso do kit *Protein 80* (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha*). Este kit é composto por uma solução gel matriz, padrão de peso molecular (*ladder*) com intervalo entre 5 a 80 kDa, solução desnaturante, solução de descoloração, microtubos próprios com coluna e filtro, e *chip* específico para proteína. O procedimento seguiu o recomendado pelo fabricante.

As amostras de leite com simulações de fraude foram preparadas em condição redutora com uso de DTT 1 M conforme o protocolo do fabricante da seguinte maneira: em microtubos de 0,5 mL foram diluídos 2 µL da solução desnaturante em 4 µL (0,018 mg/mL) de amostra seguido de homogeneização e centrifugação em minicentrífuga (Modelo *Minitube*, Maxlabor, Presidente Prudente, São Paulo), por 15 s. Para a desnaturação das proteínas, as amostras e o mix de proteínas padrão foram aquecidos a 95°C por 5 min., e após esse período, foram imediatamente armazenadas em gelo por 15 s seguido de homogeneização por vórtex. Posteriormente, foram adicionados 84 µL de água ultrapura em cada microtubo. Em seguida, realizou-se homogeneização das amostras e então foram mantidas em temperatura ambiente até a aplicação no *chip*.

No *chip* foram aplicados 4 µL de amostra e 6 µL do *ladder* e a corrida eletroforética aconteceu por 30 minutos no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* assim como orienta o protocolo do fabricante.

4.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As análises das amostras fraudadas foram feitas de acordo com o delineamento em blocos completos casualizados. Neste delineamento todos os tratamentos (níveis crescentes de adição de soro) das amostras de leite foram aplicados dentro do *chip* (blocos), totalizando nove *chips* para cada tipo de leite, ou seja, nove repetições de tal modo que todos os tratamentos estivessem contidos num mesmo *chip*. Ainda seguindo o conceito deste tipo de delineamento, as amostras adulteradas, foram aplicadas de modo aleatório no *chip*. A Figura 1 apresenta um esquema simplificado deste tipo de delineamento.

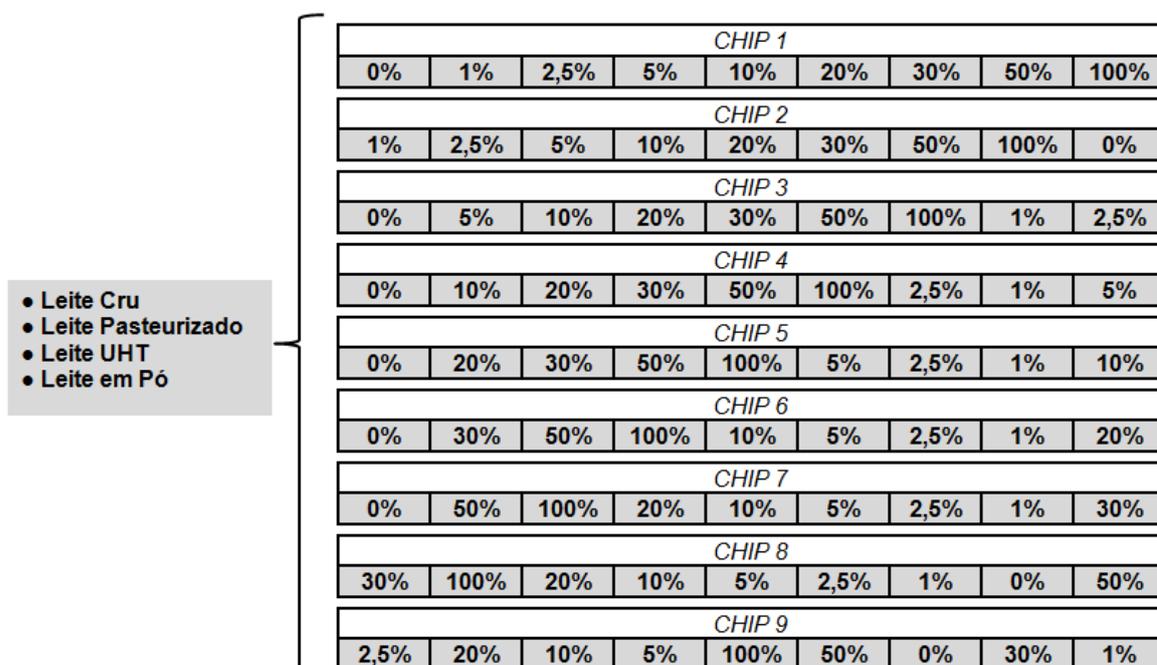


Figura 1- Esquema de blocos completos casualizados. Cada um dos *chips* representa um bloco com todos os tratamentos (adição de soro) distribuídos aleatoriamente. Esta estratégia foi empregada para os quatro tipos de leite: cru, pasteurizado, UHT e em pó adulterados com soro de queijo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPARAÇÃO ENTRE O COMPORTAMENTO DAS PROTEÍNAS DOS LEITES CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ FRAUDADOS COM SORO, PELO MÉTODO ELETROFORÉTICO *LAB-ON-A-CHIP*

Dados quantitativos tais como peso molecular, área do pico das proteínas, porcentagem proteica total e altura do pico proteico das proteínas do leite, α -CN, β -CN, κ -CN e das proteínas do soro β -LG e α -LA, foram estimados automaticamente pelo software *Agilent 2100 Expert*. A partir da análise comparativa dessas informações foi evidente que a variável área da caseína do leite da classe α , apresentou comportamento semelhante para todas as amostras testadas no estudo. Por este motivo, este dado foi utilizado como indicador quantitativo de fraude em leite pela adição de soro de queijo.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada com base nos dados tabulados para cada proteína e para cada tipo de leite: cru, pasteurizado, UHT e em pó. A ANOVA, neste caso, é um teste de hipóteses que visa verificar se alguma das variáveis explicativas (X_1 e X_2) pode ser retirada do modelo. A hipótese nula é o coeficiente da variável X_2 , representado por a_2 , e é igual a zero ($H_0: a_2 = 0$). Em outras palavras, significa que o nível de adição de soro não influencia no comportamento das proteínas do leite. A hipótese alternativa ($H_1: a_2 \neq 0$) é que esse coeficiente não é nulo, ou seja, o tratamento com soro tem influência nas proteínas do leite.

No estudo em questão, os resultados obtidos com a ANOVA foram suficientes para comprovar que houve diferença, isto é, foram significativos para mostrar que o comportamento das proteínas do leite foi influenciado pela adição de soro. Com isso conclui-se que a hipótese nula foi rejeitada, influenciando no erro tipo I sendo necessário prosseguir com um teste de comparações múltiplas. Sendo assim, o teste de Dunnet foi aplicado com o objetivo de comparar se as amostras consideradas como controle (0% = leite puro de cada tipo de leite) teriam diferença em relação as amostras as quais os tratamentos (adições de soro nos níveis 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 50 e 100%) foram empregados. Os resultados estão apresentados nos tópicos que seguem.

5.1.1. Análise quantitativa das amostras de leite cru fraudadas com soro de queijo

As médias das áreas dos picos das proteínas do leite cru fraudado com níveis crescentes de soro apresentaram valores uniformes. As médias das áreas das caseínas e das proteínas do soro, estimadas a partir das nove repetições realizadas com a técnica *lab-on-a-chip* estão contidas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Valor médio da área dos picos das principais frações proteicas das amostras de leite cru com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtido com a técnica *lab-on-a-chip*.

| Níveis de adição de soro | Áreas* | | | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | Principais proteínas do leite | | | | |
| | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
| 0% | 652,62 | 645,74 | 34,49 | 61,37 | 48,59 |
| 1% | 604,74 | 609,57 | 33,38 | 55,30 | 47,44 |
| 2,5% | 561,02 | 574,31 | 28,01 | 53,91 | 42,65 |
| 5,0% | 519,50 | 548,10 | 27,24 | 49,85 | 38,77 |
| 10,0% | 492,72 | 517,82 | 23,99 | 48,22 | 31,48 |
| 20,0% | 353,45 | 383,99 | 14,86 | 41,22 | 30,99 |
| 30,0% | 333,46 | 356,57 | 17,82 | 44,19 | 29,46 |
| 50,0% | 238,59 | 249,36 | 13,16 | 44,41 | 30,89 |
| 100,0% | - | - | - | 37,51 | 20,64 |

*Média calculada a partir das nove repetições realizadas com a técnica de eletroforese *lab-on-a-chip*.

De acordo com os valores das áreas apresentados na tabela acima, se percebe uma redução gradativa à medida que se eleva a adição de soro de queijo no leite cru, com destaque para as proteínas α -CN e β -CN, as quais apresentaram tendência de diminuir até o nível de 50% de adição de soro. Este comportamento não foi demonstrado pela proteína κ -CN que com 30% de soro de queijo, teve seu valor da área aumentado em 2,9 quando comparado ao nível anterior. Ao comparar a média da área obtida para os picos das proteínas α -CN e β -CN em 0% (652,62 e 645,74, respectivamente) com os valores médios da área dos picos para as mesmas proteínas com 50% de adição de soro (238,59 para α -CN e 249,36 para β -CN), fica evidente que tais valores das áreas dos picos proteicos foram reduzidos de forma regular.

Esses dados analisados pelo teste de Dunnet, resultaram em diferença significativa para as caseínas ($p < 0,05$), como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação dos níveis de significância das caseínas do leite α , β e κ -CN entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite cru, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína α -CN | | Proteína β -CN | | Proteína κ -CN | |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | | T1 | |
| T2 | 0,0425 | T2 | 0,0316 | T2 | 0,8685 |
| T3 | < 0,0001 | T3 | 0,0002 | T3 | 0,0670 |
| T4 | < 0,0001 | T4 | 0,0013 | T4 | < 0,0001 |
| T5 | < 0,0001 | T5 | < 0,0001 | T5 | < 0,0001 |
| T6 | < 0,0001 | T6 | < 0,0001 | T6 | < 0,0001 |
| T7 | < 0,0001 | T7 | < 0,0001 | T7 | < 0,0001 |
| T8 | < 0,0001 | T8 | < 0,0001 | T8 | < 0,0001 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

Com base no exposto na tabela 2 acima, concluí-se que para as caseínas α e β os resultados foram significativos estatisticamente a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) a partir de 1% de adição de soro de queijo, padrão este que se manteve até o nível de 50% de adição. Para a proteína κ -CN, com 5% de adição de soro de queijo em diante, foi possível constatar a adulteração no leite em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Isto quer dizer que houve diferença entre as médias das áreas dos picos das proteínas, ou seja, as médias não são iguais quando comparados os tratamentos: T1 (0%) e T2; T1 (0%) e T3 (2,5%); T1 (0%) e T4 (5%); T1 (0%) e T5 (10%); T1 (0%) e T6 (20%); T1 (0%) e T7 (30%) e T1 (0%) e T8 (50%) para as proteínas α e β ; e entre as comparações T1 (0%) e T4 (5%); T1 (0%) e T5 (10%); T1 (0%) e T6 (20%); T1 (0%) e T7 (30%) e T1 (0%) e T8 (50%) para a κ -CN.

Estes resultados sugerem que a técnica *lab-on-a-chip* foi capaz de detectar a fraude em leite cru por adição de soro de queijo a partir do menor nível de adição (1%) para as principais proteínas do leite, o que pode tornar o método um aliado nas análises de rotina laboratorial que visa o controle da qualidade e a garantia da genuinidade do leite.

Ao contrário disso, os resultados da análise estatística de dados das proteínas do soro β -LG e α -LA apresentaram uma reação diferente daquela esperada, já que essas proteínas tiveram seus valores de área também diminuídos conforme o aumento da proporção de soro. Além disso, os valores de área para essas proteínas não teve diminuição contínua, como a ocorrida com as caseínas do

leite. A Tabela 3 traz os valores de área do pico das proteínas do soro pela técnica *lab-on-a-chip* e seus respectivos níveis de significância, quando analisados pelo teste de Dunnet, os quais estão maiores que 5%, o que significa dizer que para os valores de médias no teste de comparação das mesmas, o resultado não foi representativo. Baseado no exposto, as proteínas do soro não são determinantes para a detecção da fraude em leite com soro de queijo pela técnica *lab-on-a-chip*.

Tabela 3 – Comparação dos níveis de significância das proteínas do soro β -LG e α -LA, entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite cru, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína β -LG | | Proteína α -LA | |
|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | |
| T2 | 0,8583 | T2 | 0,9998 |
| T3 | 0,8374 | T3 | 1,0000 |
| T4 | 0,9767 | T4 | 1,0000 |
| T5 | 0,9576 | T5 | 1,0000 |
| T6 | 0,9997 | T6 | 0,9999 |
| T7 | 1,0000 | T7 | 0,7207 |
| T8 | 1,0000 | T8 | < 0,0001 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

5.1.2. Análise quantitativa das amostras de leite pasteurizado fraudadas com soro de queijo

Os valores médios das áreas dos picos das proteínas do leite pasteurizado com simulação de adulteração com soro de queijo, calculados a partir das 9 repetições realizadas com a técnica *lab-on-a-chip*, estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Valor médio da área dos picos das principais frações proteicas das amostras de leite pasteurizado com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtido com a técnica *lab-on-a-chip*.

| Níveis de adição de soro | Áreas* | | | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | Principais proteínas do leite | | | | |
| | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
| 0% | 691,41 | 688,59 | 37,40 | 53,17 | 59,81 |
| 1% | 660,79 | 670,97 | 37,30 | 49,86 | 50,09 |
| 2,5% | 544,61 | 569,97 | 32,40 | 41,31 | 43,78 |

| Níveis de adição de soro | Áreas* | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | Principais proteínas do leite | | | | |
| | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
| 5,0% | 494,58 | 526,11 | 25,70 | 41,94 | 45,94 |
| 10,0% | 456,50 | 494,21 | 23,20 | 38,30 | 40,59 |
| 20,0% | 361,90 | 397,40 | 16,10 | 36,29 | 34,18 |
| 30,0% | 293,31 | 324,04 | 10,10 | 36,72 | 30,69 |
| 50,0% | 202,72 | 223,71 | 7,80 | 38,88 | 30,30 |
| 100,0% | - | - | - | 47,83 | 24,54 |

*Média calculada a partir das 9 repetições realizadas com a técnica de eletroforese *lab-on-a-chip*.

Os dados tabulados apresentados na Tabela 4 destacam as proteínas α -CN, β -CN e κ -CN para a redução do valor da área do pico de tais proteínas. Isso também aconteceu com as amostras de leite cru sob as mesmas condições. Porém, no entanto, os resultados foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) somente para a α -CN. As proteínas β -CN e κ -CN por sua vez, embora tenham tido seus valores de média reduzidos à medida que a proporção de soro aumentou, não mostraram resultados significativos estatisticamente quando comparados àqueles da α -CN, ao realizar o teste de comparação entre as médias (Tabela 5). Neste caso, os resultados para a caseína α corrobora com o comportamento exibido por essa mesma proteína para as amostras de leite cru fraudadas com soro, onde a partir de 1% de adição de soro de queijo, a fraude foi detectada.

Tabela 5 – Comparação dos níveis de significância das caseínas do leite α , β e κ -CN entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite pasteurizado, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína α -CN | | Proteína β -CN | | Proteína κ -CN | |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | | T1 | |
| T2 | 0,0410 | T2 | 0,2098 | T2 | 0,1316 |
| T3 | < 0,0001 | T3 | 0,3140 | T3 | 0,0081 |
| T4 | < 0,0001 | T4 | 0,2250 | T4 | 0,0108 |
| T5 | < 0,0001 | T5 | 0,0130 | T5 | 0,0095 |
| T6 | < 0,0001 | T6 | 0,0525 | T6 | 0,0026 |
| T7 | < 0,0001 | T7 | 0,0177 | T7 | < 0,0001 |
| T8 | < 0,0001 | T8 | 0,5055 | T8 | < 0,0001 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

Ao analisar a tabela 5 acima, é visível que a caseína α teve seus resultados significativos estatisticamente a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) a partir de 1% de adição de soro de queijo, cujo padrão se manteve até o nível de 50% de adição. Ou seja, as médias não são iguais quando são comparados os tratamentos: T1 (0%) e T3 (2,5%); T1 (0%) e T4 (5%); T1 (0%) e T5 (10%); T1 (0%) e T6 (20%); T1 (0%) e T7 (30%) e T1 (0%) e T8 (50%).

Já para as caseínas β -CN e κ -CN, os resultados foram opostos àqueles obtidos com as amostras de leite cru, não representando nenhuma conformidade entre os valores, o que implica em dizer que não têm significância estatística dentro das condições empregadas. Sendo assim, a proteína α -CN, foi determinante para a detecção da fraude em leite pela adição de soro de queijo com o método *lab-on-a-chip*.

Os resultados da análise de dados das proteínas do soro também não foram positivos. As áreas dos picos não aumentaram como se esperava e os resultados não foram estatisticamente significativos, como pode ser observado na Tabela 6. Deste modo, pode-se dizer que a reação dessas proteínas frente a técnica *lab-on-a-chip* sob as condições impostas pelo estudo demonstrou instabilidade nos valores das áreas quantificados. Sendo assim, com as áreas apresentadas para essas proteínas, significa dizer, que elas não contribuíram para a detecção de fraude em leite pela adição de soro de queijo, resultado este que coincide com o encontrado também para as amostras de leite cru.

Tabela 6 – Comparação dos níveis de significância das proteínas do soro β -LG e α -LA, entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite pasteurizado, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína β -LG | | Proteína α -LA | |
|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | |
| T2 | 0,9995 | T2 | 0,1316 |
| T3 | 0,8950 | T3 | 0,0081 |
| T4 | 0,9996 | T4 | 0,0108 |
| T5 | 1,0000 | T5 | 0,0095 |
| T6 | 1,0000 | T6 | 0,0026 |
| T7 | 1,0000 | T7 | < 0,0001 |
| T8 | 1,0000 | T8 | < 0,0001 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

5.1.3. Análise quantitativa das amostras de leite UHT fraudadas com soro de queijo

As médias dos valores de área das proteínas do leite UHT com adição de soro de queijo foram determinadas pelo cálculo dos dados referentes a área de cada proteína, os quais foram estimados automaticamente nas nove repetições com a realização da eletroforese *lab-on-a-chip*. A Tabela 7 a seguir, contém os valores médios das áreas das frações proteicas do leite UHT com simulação de adulteração.

Tabela 7- Valor médio da área dos picos das principais frações proteicas das amostras de leite UHT com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtido com a técnica *lab-on-a-chip*

| Níveis de adição de soro | Áreas* | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | Principais proteínas do leite | | | | |
| | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
| 0% | 686,60 | 772,07 | 47,38 | 40,87 | 23,56 |
| 1% | 642,80 | 733,09 | 42,81 | 43,59 | 23,70 |
| 2,5% | 536,90 | 614,70 | 25,17 | 35,08 | 23,52 |
| 5,0% | 481,80 | 571,32 | 25,93 | 32,71 | 24,37 |
| 10,0% | 431,90 | 514,28 | 19,68 | 32,01 | 24,43 |
| 20,0% | 358,20 | 432,49 | 10,50 | 30,59 | 26,06 |
| 30,0% | 305,70 | 369,76 | 2,64 | 30,37 | 23,84 |
| 50,0% | 239,30 | 284,93 | 2,31 | 40,49 | 31,56 |
| 100,0% | - | - | - | 52,31 | 38,71 |

*Média calculada a partir das 9 repetições realizadas com a técnica de eletroforese *lab-on-a-chip*.

Avaliando as informações da Tabela 7, verifica-se que as caseínas do leite das classes α , β e κ -CN tiveram seus valores de área reduzidos à medida que o nível de adição de soro aumentou. Estes resultados foram significativos estatisticamente ($p < 0,05$) a partir de 1% de adição de soro de queijo para as proteínas α e β caseínas; e a partir de 2,5% de soro para a κ -CN, conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação dos níveis de significância das caseínas do leite α , β e κ -CN entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite UHT, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína α -CN | | Proteína β -CN | | Proteína κ -CN | |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | | T1 | |
| T2 | 0,0239 | T2 | 0,0347 | T2 | 0,1871 |
| T3 | < 0,0001 | T3 | < 0,0001 | T3 | < 0,0001 |
| T4 | < 0,0001 | T4 | < 0,0001 | T4 | < 0,0001 |
| T5 | < 0,0001 | T5 | < 0,0001 | T5 | < 0,0001 |
| T6 | < 0,0001 | T6 | < 0,0001 | T6 | < 0,0001 |
| T7 | < 0,0001 | T7 | < 0,0001 | T7 | < 0,0001 |
| T8 | < 0,0001 | T8 | < 0,0001 | T8 | < 0,0001 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

Considerando os valores expressos na Tabela 8, constata-se que a fraude pela adição de soro de queijo foi detectada pelas caseínas do leite UHT: a partir de 1% de adição de soro de queijo para a α e β -CN e 2,5% de adição para a κ -CN, a um nível de significância de 5%. Com base neste resultado pode-se concluir que houve diferença entre as médias das áreas dos picos proteicos quando comparados os tratamentos: T1 (0%) e T2 (1%); T1 (0%) e T3 (2,5%); T1 (0%) e T4 (5%); T1 (0%) e T5 (10%); T1 (0%) e T6 (20%); T1 (0%) e T7 (30%) e T1 (0%) e T8 (50%) para as caseínas α e β ; e T1 (0%) e T3 (2,5%); T1 (0%) e T4 (5%); T1 (0%) e T5 (10%); T1 (0%) e T6 (20%); T1 (0%) e T7 (30%) e T1 (0%) e T8 (50%) para a κ -CN.

Ao contrário disso, os dados das análises das áreas dos picos das proteínas do soro não foram representativos e se mostraram opostos ao objetivo esperado, pois as áreas dos picos reduziram. Em consequência, os resultados estatísticos também não foram significativos, de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação dos níveis de significância das proteínas do soro β -LG e α -LA, entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite pasteurizado, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína β -LG | | Proteína α -LA | |
|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | |
| T2 | 0,9943 | T2 | 0,9009 |
| T3 | 0,0691 | T3 | 0,8860 |
| T4 | 0,0067 | T4 | 0,9441 |
| T5 | 0,0030 | T5 | 0,9474 |
| T6 | 0,0005 | T6 | 0,9907 |

| Proteína β -LG | | Proteína α -LA | |
|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T7 | 0,0004 | T7 | 0,9119 |
| T8 | 0,8503 | T8 | 1,0000 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

5.1.4. Análise quantitativa das amostras de leite em pó fraudadas com soro de queijo

A distribuição dos valores médios das áreas das proteínas do leite em pó com adição crescente de soro de queijo, estimados a partir das nove repetições realizadas com o método *lab-on-a-chip*, está disposta na Tabela 10.

Tabela 10 - Valor médio da área dos picos das principais frações proteicas das amostras de leite em pó com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtido com a técnica *lab-on-a-chip*

| Níveis de adição de soro | Áreas* | | | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | Principais proteínas do leite | | | | |
| | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
| 0% | 773,90 | 1141,46 | 22,78 | 12,59 | 16,08 |
| 1% | 727,87 | 1075,37 | 17,38 | 16,89 | 11,88 |
| 2,5% | 651,78 | 989,76 | 14,27 | 12,66 | 12,50 |
| 5,0% | 592,64 | 901,33 | 14,54 | 16,99 | 11,68 |
| 10,0% | 536,19 | 847,49 | 14,42 | 18,98 | 9,86 |
| 20,0% | 421,97 | 673,11 | 13,24 | 19,37 | 9,68 |
| 30,0% | 355,21 | 580,01 | 10,27 | 18,18 | 8,55 |
| 50,0% | 260,64 | 424,82 | 7,68 | 28,22 | 13,01 |
| 100,0% | - | - | - | 61,88 | 25,83 |

*Média calculada a partir das 9 repetições realizadas com a técnica de eletroforese *lab-on-a-chip*.

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 10 observa-se a regularidade com que as médias dos picos das proteínas α -CN e β -CN reduziram à medida que adição de soro de queijo foi acrescida na amostra do leite em pó. Assim como para as amostras de leite cru, pasteurizado e UHT, houve redução representativa quando se compara os valores entre as médias obtidas em 0 e 50% dessas proteínas em questão. A proteína κ -CN, embora seus valores de área dos picos proteicos entre os níveis de adulteração tenham apresentado certa

uniformidade, na proporção de 5%, houve um leve aumento, da mesma maneira como verificado para as amostras de leite UHT com adição de soro.

Na análise estatística dos dados, as caseínas do leite mais uma vez foram determinantes na detecção da fraude pela adição de soro de queijo, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Estes resultados estão apresentados na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11 – Comparação dos níveis de significância das caseínas do leite α , β e κ -CN entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite em pó, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína α -CN | | Proteína β -CN | | Proteína κ -CN | |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | | T1 | |
| T2 | 0,0310 | T2 | 0,0210 | T2 | 0,0254 |
| T3 | < 0,0001 | T3 | < 0,0001 | T3 | < 0,0001 |
| T4 | < 0,0001 | T4 | < 0,0001 | T4 | < 0,0001 |
| T5 | < 0,0001 | T5 | < 0,0001 | T5 | < 0,0001 |
| T6 | < 0,0001 | T6 | < 0,0001 | T6 | < 0,0001 |
| T7 | < 0,0001 | T7 | < 0,0001 | T7 | < 0,0001 |
| T8 | < 0,0001 | T8 | < 0,0001 | T8 | < 0,0001 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 11, conclui-se que a fraude pela adição de soro de queijo foi detectada pelas caseínas do leite em pó a partir de 1% de adição de soro de queijo ao nível de significância de 5%. Com base neste resultado pode-se concluir que houve diferença entre as médias das áreas dos picos proteicos quando comparados os tratamentos: T1 (0%) e T2 (1%); T1 (0%) e T3 (2,5%); T1 (0%) e T4 (5%); T1 (0%) e T5 (10%); T1 (0%) e T6 (20%); T1 (0%) e T7 (30%) e T1 (0%) e T8 (50%).

Já para as proteínas do soro os valores das áreas não demonstraram regularidade, pois não houve padrão de redução ou aumento de seus valores. Além disso, pela análise estatística não foi obtido resultados significativos ao nível de significância de 5%, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 – Comparação dos níveis de significância das proteínas do soro β -LG e α -LA, entre os tratamentos aplicados nas amostras de leite em pó, obtidos pelo teste de Dunnet

| Proteína β -LG | | Proteína α -LA | |
|----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Tratamento | Valor de p | Tratamento | Valor de p |
| T1 | | T1 | |
| T2 | 0,9995 | T2 | 0,9798 |
| T3 | 0,8950 | T3 | 0,8678 |
| T4 | 0,9996 | T4 | 0,9752 |
| T5 | 1,0000 | T5 | 0,9973 |
| T6 | 1,0000 | T6 | 0,9998 |
| T7 | 1,0000 | T7 | 1,000 |
| T8 | 1,0000 | T8 | 1,000 |

Legenda: T1: Tratamento 1 – 0% de adição de soro; T2: Tratamento 2 – 1% de adição de soro; T3: Tratamento 3 – 2,5% de adição de soro; T4: Tratamento 4 – 5% de adição de soro; T5: Tratamento 5 – 10% de adição de soro; T6: Tratamento 6 – 20% de adição de soro; T7: Tratamento 7: 30% de adição de soro; T8: Tratamento 8 – 50% de adição de soro.

5.2. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS LEITES CRU, PASTEURIZADO, UHT E EM PÓ FRAUDADOS COM SORO DE QUEIJO, PELO MÉTODO ELETROFORÉTICO SDS-PAGE

A análise quantitativa das proteínas do leite, realizada pelo software *ImageQuant TL*, estima automaticamente valores de massa molecular (perfil proteico), área, porcentagem total para cada proteína e tempo de migração que está intimamente ligado aos valores de massa molecular. O perfil proteico do leite é amplamente descrito em muitos trabalhos e já é bastante conhecido no setor leiteiro com a técnica SDS-PAGE (VELOSO et al., 2002).

O método em SDS-PAGE foi eficiente com relação, principalmente, a separação das proteínas e das estimativas de suas respectivas massas moleculares. Farrel Jr. e colaboradores (2004), Anema (2009), Marques e colaboradores (2011) e Meurer (2014) encontraram valores de massa molecular para as principais proteínas do leite semelhantes aos obtidos neste estudo. Na Tabela 13 está apresentada a comparação dos valores de massa molecular obtidos para amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó adulteradas com soro de queijo com os valores de massa já descritos em alguns estudos.

Tabela 13—Valores estimados da massa molecular das caseínas do leite e das proteínas do soro para as amostras dos leites cru, pasteurizado, UHT e em pó, comparados com os valores de massa molecular descritos na literatura através da utilização da técnica SDS-PAGE

| Proteínas do leite | MW (kDa) | | | | | | |
|--------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|-------|--------|-------|-------|
| | Leite bovino | | L.C. | L.P. | L. UHT | L.Pó | |
| α -CN | 30 \pm 3 ^[1] | 23,6 ^[2] | 29,94 ^[3] | 30,66 | 32,09 | 31,58 | 32,41 |
| β -CN | 27 \pm 4 ^[1] | 25,2 ^[2] | 28,03 ^[3] | 25,90 | 26,33 | 26,64 | 26,29 |
| κ -CN | 24 \pm 4 ^[1] | 19,0 ^[2] | 25,72 ^[3] | 23,02 | 23,06 | 23,45 | 23,24 |
| β -LG | 19 \pm 2 ^[1] | 18,3 ^[2] | 16,63 ^[3] | 13,47 | 13,35 | 13,59 | 13,57 |
| α -LA | 13 \pm 3 ^[1] | 14,1 ^[2] | 12,56 ^[3] | 11,03 | 10,85 | 11,04 | 10,99 |

[1] – Massas moleculares estimadas por Anema (2009). [2] – Massas moleculares estimadas por Farrel Jr. et al. (2004). [3] – Massas moleculares estimadas por Meurer (2014). L.C. – Leite cru. L. P. – Leite pasteurizado. L. UHT. – Leite UHT. L. Pó. – Leite em pó.

Com base nos valores expostos na Tabela 13 pode ser observado que houve pouca variação nas massas moleculares estimadas para as caseínas do leite nas amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó em comparação com àquelas descritas na literatura apresentada. Farrel Jr (2004) e colaboradores relataram que as principais faixas caseínicas estão em torno de 19 a 25 kDa, no entanto, neste estudo, as caseínas do leite migraram a uma faixa próxima a 30 kDa e até um pouco maior que este valor, assim como apresentado por Marques e colaboradores (2011) ao analisarem amostras de leite em pó pela técnica SDS-PAGE. Isto pode ter acontecido devido a ligação em formas variadas das proteínas ao SDS ou ainda pela interação das frações de caseínas separadas (MARQUES et al., 2011).

Embora o perfil proteico dos leites analisados tenha tido poucas variações com relação aos valores de massa molecular das principais proteínas do leite, estes ainda estão bastante próximos daqueles obtidos na literatura para a técnica SDS-PAGE, o que implica dizer que tal método foi eficaz na separação e quantificação das proteínas do leite.

Entretanto, para identificação de fraude em leite pela adição de soro de queijo, as massas moleculares estimadas parecem não sofrer alterações significativas não sendo possível a detecção da fraude por esta variável. Em contrapartida, as outras variáveis fornecidas pelo software específico não exibiram um comportamento uniforme com relação a diminuição de caseínas como demonstrado pela técnica *lab-on-a-chip*, nem tampouco para as proteínas do soro. O motivo pelo qual isto pode ter acontecido pode ter relação com a sensibilidade do método SDS-PAGE que não foi capaz de detectar fraude no leite pela adição de soro de queijo.

5.2.1. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite cru fraudado com soro de queijo

Os dados fornecidos pelo software *ImageQuant TL*, especificamente valor de área das bandas das proteínas do leite cru α -CN, β -CN, κ -CN, β -LG e α -LA com adição de soro de queijo estão distribuídos na Tabela 14.

Tabela 14 – Distribuição dos valores da variável área das frações proteicas do leite cru com soro de queijo estimados pela análise dos geis SDS-PAGE no software *ImageQuant TL*

| Proteínas do leite | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
|--------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| Variáveis | Área* | Área* | Área* | Área* | Área* |
| 0% | 1328,00 | 738,67 | 486,67 | 576,67 | 630,00 |
| 1% | 1312,00 | 722,67 | 576,00 | 576,00 | 668,67 |
| 2,5% | 1276,67 | 701,33 | 669,33 | 504,00 | 648,00 |
| 5,0% | 1239,33 | 665,33 | 575,33 | 469,33 | 665,33 |
| 10,0% | 1256,00 | 666,68 | 574,00 | 413,33 | 629,33 |
| 20,0% | 1274,67 | 666,67 | 430,67 | 502,67 | 573,33 |
| 30,0% | 1110,00 | 703,33 | 540,67 | 556,00 | 631,33 |
| 50,0% | 917,33 | 615,33 | 595,33 | 522,67 | 505,33 |
| 100,0% | - | - | - | 540,67 | 626,67 |

*Valores médios calculados a partir das repetições realizadas com a técnica SDS-PAGE.

Avaliando os dados apresentados na Tabela 14 é possível observar um que os valores não assumiram um padrão homogêneo de redução ou aumento da área das bandas das proteínas do leite cru à medida que os níveis de soro aumentaram. De acordo com a variável analisada, esperava-se que houvesse redução desses valores para as caseínas e um aumento dessa mesma variável para as proteínas do soro. No entanto, este comportamento não foi exibido para as amostras de leite cru com adição de soro de queijo.

Com base nas Figuras 6 e 7, nas quais estes resultados estão demonstrados graficamente, observa-se melhor a desordem da variável área das bandas das proteínas do leite cru.

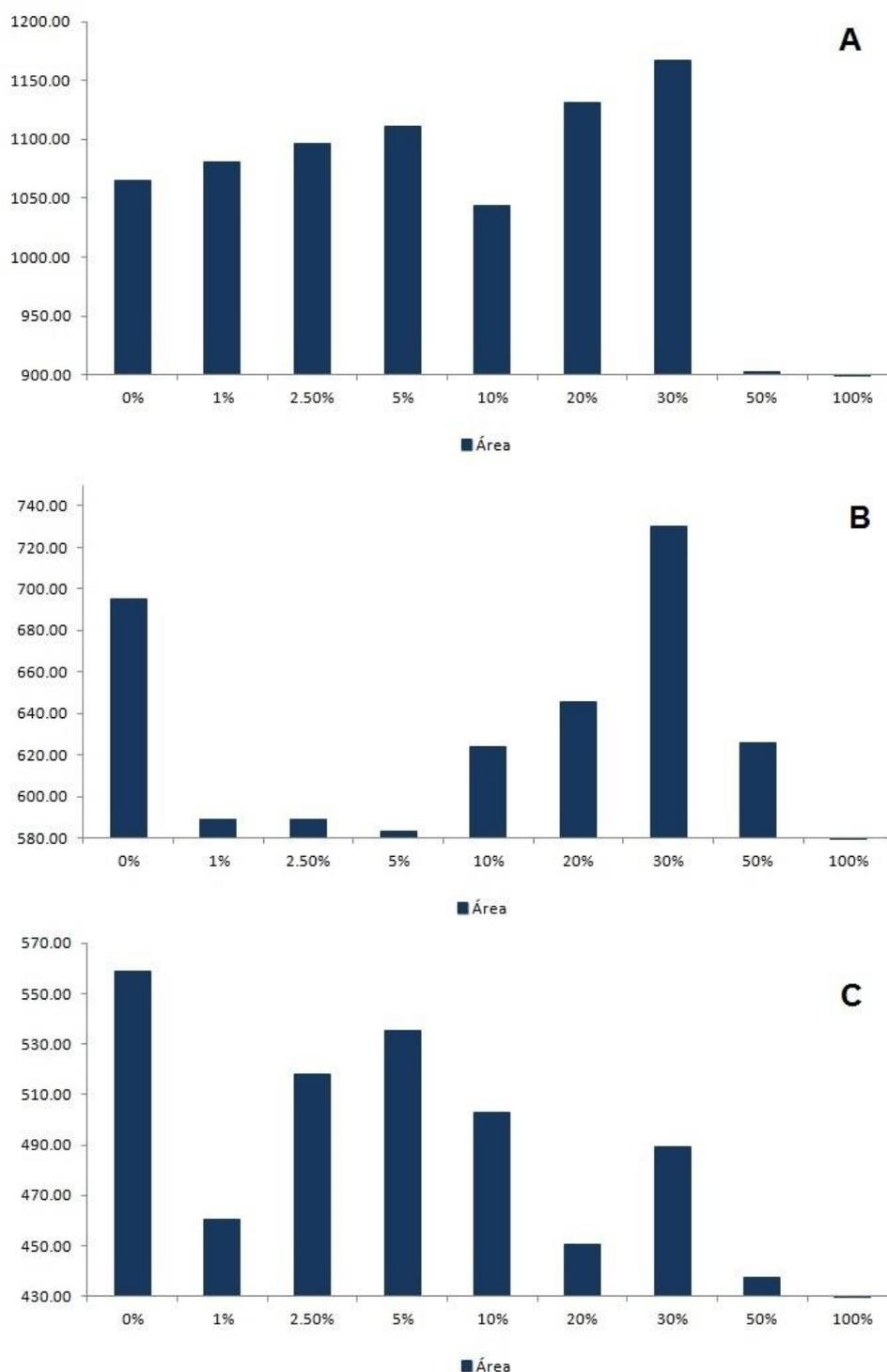


Figura 06 – Representação gráfica do comportamento da variável área das caseínas do leite cru com adição de soro de queijo obtidas com a técnica SDS-PAGE. A: Demonstração da caseína alfa (α). B: Apresentação da caseína beta (β). C: Representação da caseína kappa (κ). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda. No eixo horizontal, estão distribuídos os níveis de adição de soro de queijo.

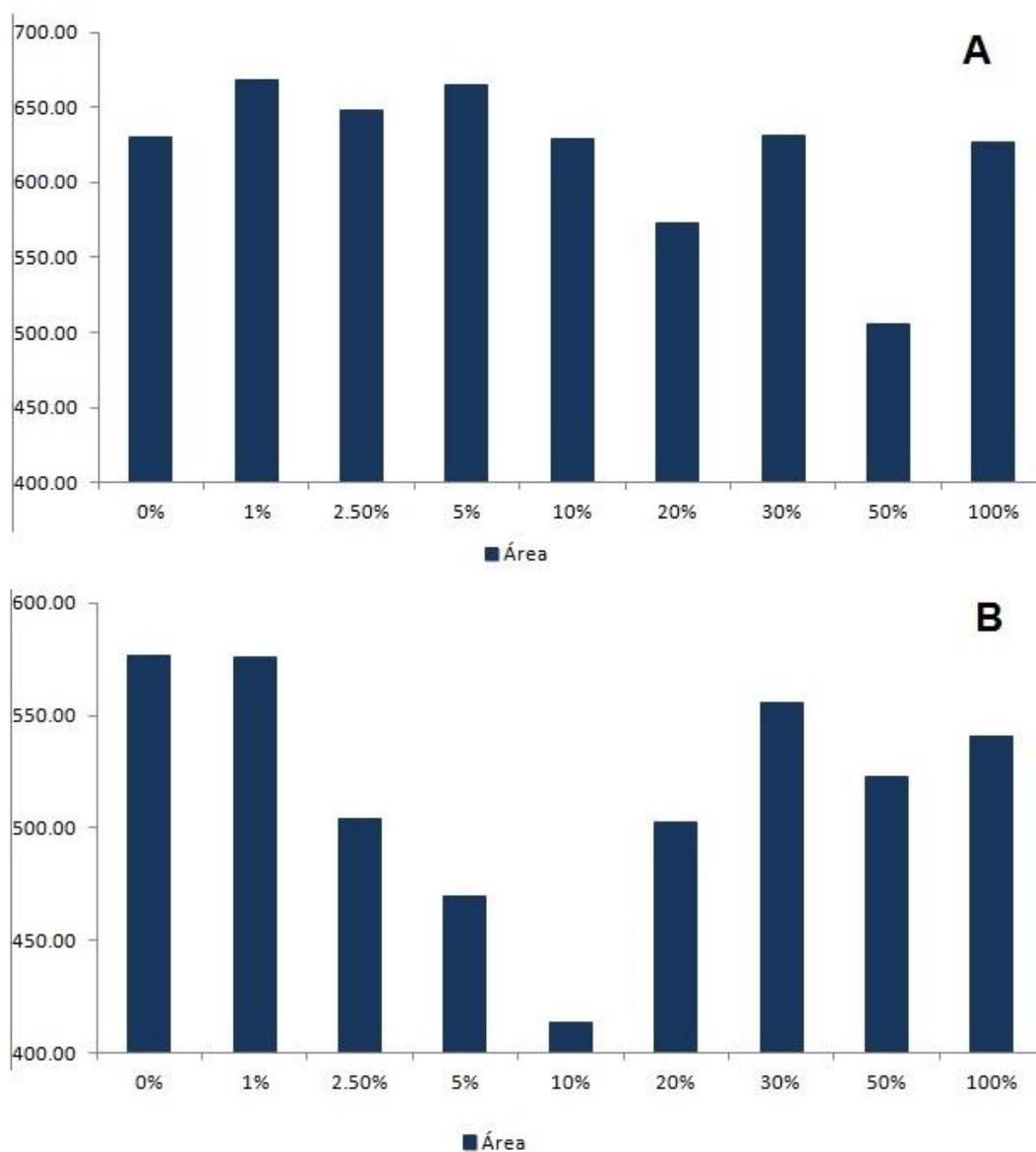


Figura 07 - Representação gráfica dos valores de área das proteínas do soro das amostras de leite cru com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtidos pela técnica SDS-PAGE. Em A está demonstrada a proteína do soro β -LG (beta lactoglobulina). Em B está apresentada a proteína do soro α -LA (alfa lactoalbumina). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda. No eixo horizontal, estão distribuídos os níveis de adição de soro de queijo.

5.2.2. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite pasteurizado fraudado com soro de queijo

A distribuição dos valores médios da variável analisada no software específico, área, obtidos como resposta do efeito da adição de soro de queijo nas amostras de leite pasteurizado, por meio da utilização do método SDS-PAGE, está expressa na Tabela 15.

Tabela 15 – Distribuição dos valores da variável área das frações proteicas do leite pasteurizado com adição de soro de queijo estimados pela análise dos géis SDS-PAGE no software *ImageQuant TL*

| Proteínas do leite | α -CN | β -CN | κ -CN | α -LA | β -LG |
|--------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| Variáveis | Área* | Área* | Área* | Área* | Área* |
| 0% | 1086,00 | 748,00 | 514,67 | 515,33 | 552,00 |
| 1% | 1050,00 | 730,00 | 533,33 | 515,33 | 551,33 |
| 2,5% | 1067,33 | 675,33 | 481,33 | 498,00 | 658,00 |
| 5,0% | 1048,67 | 711,33 | 392,00 | 480,00 | 658,67 |
| 10,0% | 1048,67 | 675,33 | 516,00 | 444,00 | 675,33 |
| 20,0% | 1028,67 | 782,00 | 445,33 | 463,33 | 533,33 |
| 30,0% | 1013,33 | 712,00 | 462,67 | 463,33 | 640,00 |
| 50,0% | 977,33 | 604,67 | 498,00 | 444,67 | 623,33 |
| 100,0% | - | - | - | 586,67 | 587,33 |

*Valores médios calculados a partir das repetições realizadas com a técnica SDS-PAGE.

A partir dos resultados demonstrados na Tabela 15 nota-se que para a variável analisada, as proteínas do leite pasteurizado não exibiram comportamento uniforme da mesma forma como ocorreu com as amostras de leite cru sob as mesmas condições. Nas Figuras 8 e 9 as caseínas e as proteínas do soro das amostras de leite pasteurizado fraudadas com soro de queijo, estão representadas graficamente. De acordo com os gráficos, é possível visualizar melhor a resposta de tais proteínas, quanto ao valor de área, obtida pela técnica SDS-PAGE.

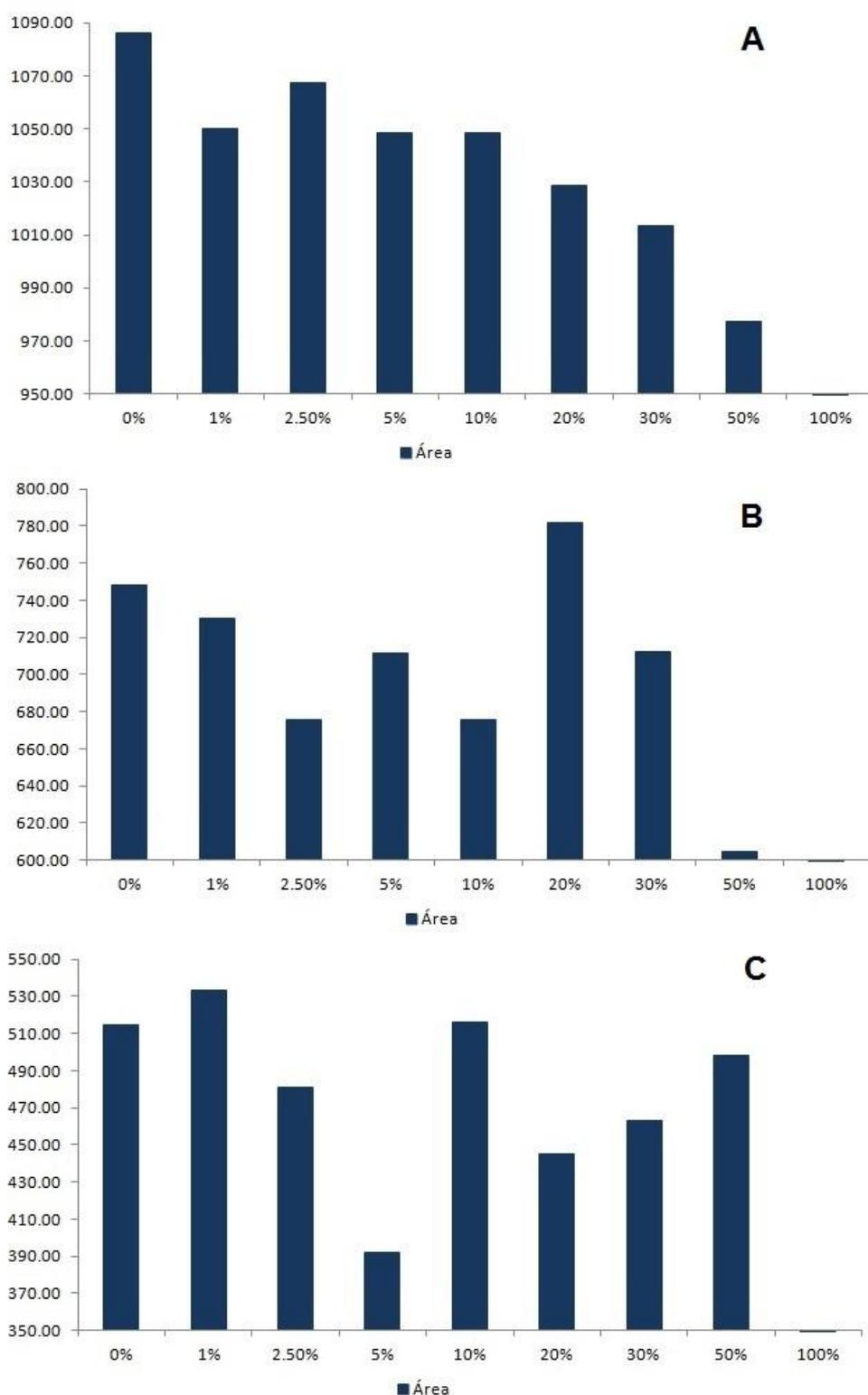


Figura 8 - Representação gráfica do comportamento da variável área das caseínas do leite pasteurizado com adição de soro de queijo obtidas com a técnica SDS-PAGE. A: Demonstração da caseína alfa (α). B: Apresentação da caseína beta (β). C: Representação da caseína kappa (κ). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda.

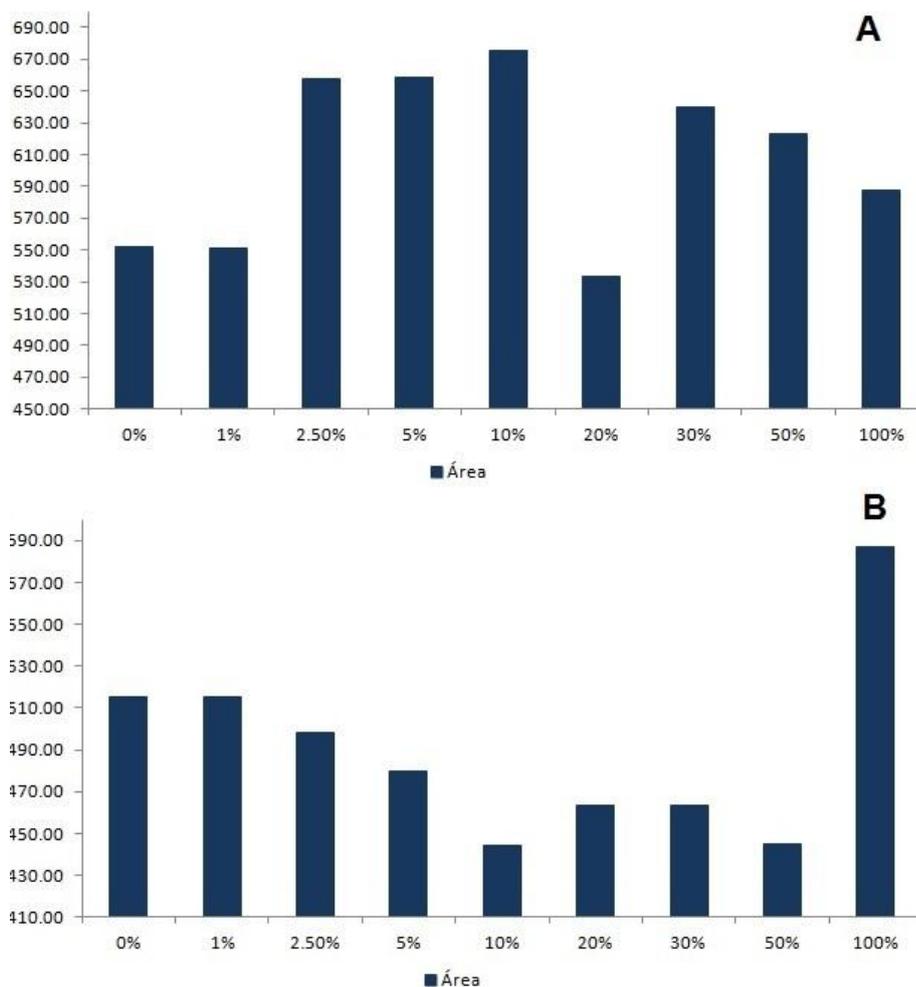


Figura 9 - Representação gráfica dos valores de área das proteínas do soro das amostras de leite pasteurizado com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtidos pela técnica SDS-PAGE. Em A está demonstrada a proteína do soro β -LG (beta lactoglobulina). Em B está apresentada a proteína do soro α -LA (alfa lactoalbumina). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda.

5.2.3. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite UHT fraudado com soro de queijo

Os resultados a partir da análise dos géis pelo software específico das amostras de leite UHT com adição de soro de queijo em níveis crescentes estão apresentados, a seguir, na Tabela 16.

Tabela 16 - Distribuição dos valores da variável área das frações proteicas do leite UHT adulterado com soro de queijo estimados pela análise dos géis SDS-PAGE no software *ImageQuant TL*

| Proteínas do leite | α-CN | β-CN | κ-CN | α-LA | β-LG |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Variáveis | Área* | Área* | Área* | Área* | Área* |
| 0% | 1065,33 | 695,33 | 558,67 | 541,33 | 614,67 |
| 1% | 1080,67 | 589,33 | 460,67 | 576,00 | 589,33 |
| 2,5% | 1096,00 | 589,33 | 518,00 | 572,00 | 556,67 |
| 5,0% | 1111,33 | 583,33 | 535,33 | 595,33 | 602,67 |
| 10,0% | 1044,00 | 624,00 | 502,67 | 580,00 | 633,33 |
| 20,0% | 1130,67 | 645,33 | 450,67 | 545,33 | 587,33 |
| 30,0% | 1167,33 | 730,00 | 489,33 | 526,00 | 576,00 |
| 50,0% | 902,67 | 626,00 | 437,33 | 541,33 | 556,67 |
| 100,0% | - | - | - | 487,33 | 604,67 |

*Valores médios calculados a partir das repetições realizadas com a técnica SDS-PAGE.

Igualmente aos resultados para as amostras de leite cru e pasteurizado fraudadas com soro de queijo, as amostras de leite UHT nesta mesma condição, reproduziram o mesmo padrão de distribuição dos valores de área para as proteínas do leite pelo método SDS-PAGE. Isto é, esta variável não contribuiu para a detecção da fraude, pois através dela não foi possível observar nenhuma diferença que indique variações das proteínas do leite UHT, assim como ocorreu com os leites cru e pasteurizado.

Os gráficos com os dados obtidos para as caseínas e proteínas do soro do leite UHT adulteradas, estão exibidos nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

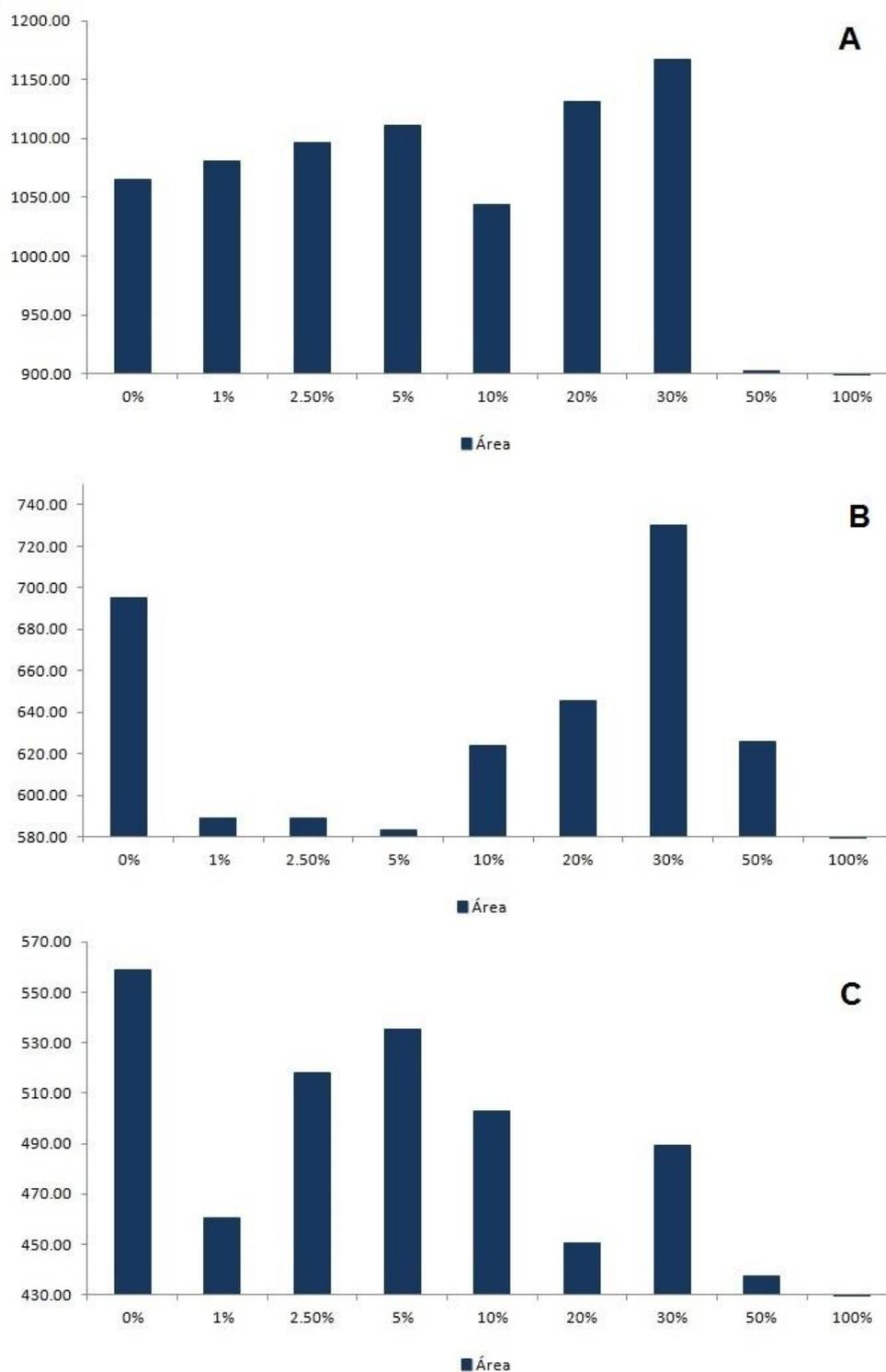


Figura 10 - Representação gráfica do comportamento da variável área das caseínas do leite UHT com adição de soro de queijo obtidas com a técnica SDS-PAGE. A: Demonstração da caseína alfa (α). B: Apresentação da caseína beta (β). C: Representação da caseína kappa (κ). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda. No eixo horizontal, estão distribuídos os níveis de adição de soro de queijo.

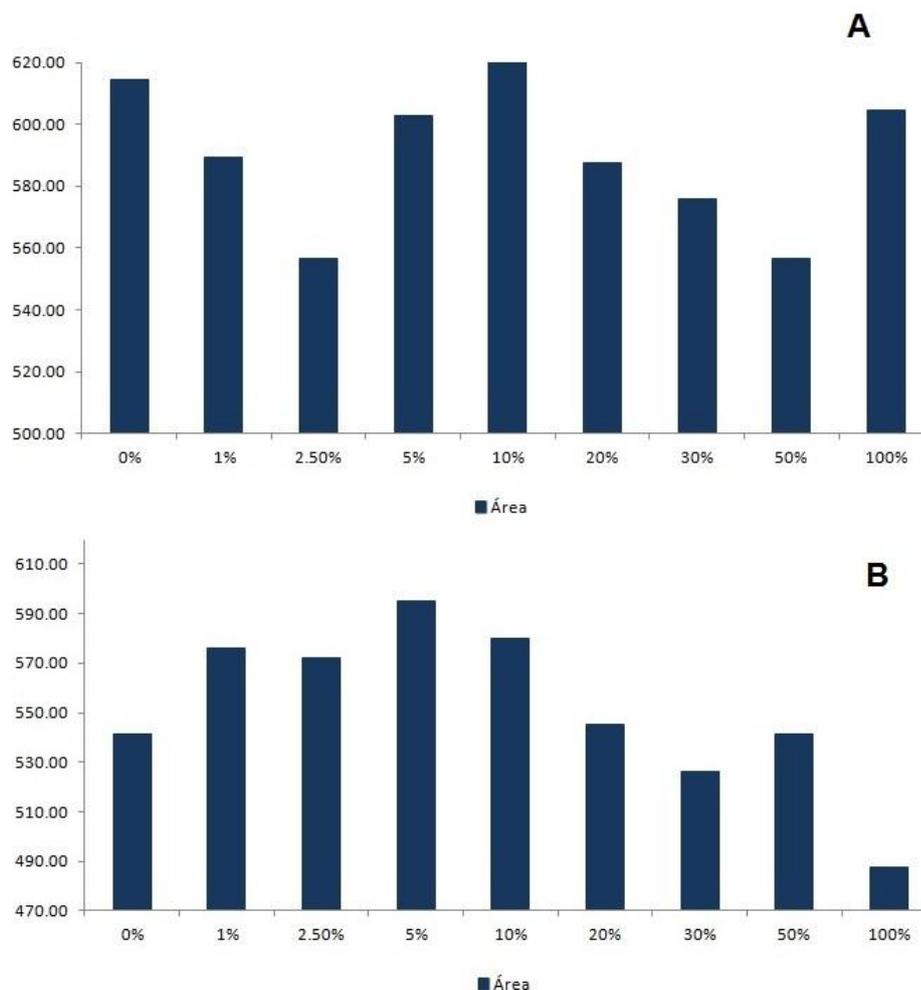


Figura 11 - Representação gráfica dos valores de área das proteínas do soro das amostras de leite UHT com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtidos pela técnica SDS-PAGE. Em A está demonstrada a proteína do soro β -LG (beta lactoglobulina). Em B está apresentada a proteína do soro α -LA (alfa lactoalbumina). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda. No eixo horizontal, estão distribuídos os níveis de adição de soro de queijo.

5.2.4. Análise quantitativa obtida pela técnica SDS-PAGE para as proteínas do leite em pó fraudado com soro de queijo

Os valores de área das proteínas do leite em pó com adição de soro de queijo, obtidos com a análise dos géis pelo software específico, estão distribuídos na Tabela 17.

Tabela 17 - Distribuição dos valores da variável área das frações proteicas do leite em pó adulterado com soro de queijo estimados pela análise dos géis SDS-PAGE no software *ImageQuant TL*

| Proteínas do leite | α-CN | β-CN | κ-CN | α-LA | β-LG |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Variáveis | Área* | Área* | Área* | Área* | Área* |
| 0% | 1146,00 | 710,00 | 606,00 | 570,67 | 729,33 |
| 1% | 1106,00 | 714,67 | 517,33 | 517,33 | 782,67 |
| 2,5% | 1231,33 | 782,00 | 482,00 | 572,67 | 695,33 |
| 5,0% | 1230,67 | 639,33 | 482,00 | 532,00 | 743,33 |
| 10,0% | 1196,00 | 744,67 | 481,33 | 498,67 | 708,67 |
| 20,0% | 1138,67 | 618,67 | 463,33 | 570,00 | 748,00 |
| 30,0% | 1228,67 | 620,00 | 516,00 | 514,00 | 606,00 |
| 50,0% | 1102,00 | 639,33 | 516,67 | 518,67 | 731,33 |
| 100,0% | - | - | - | 532,00 | 694,67 |

*Valores médios calculados a partir das repetições realizadas com a técnica SDS-PAGE.

Ao observar os valores expressos na tabela 17, observa-se que as proteínas do leite, novamente, não seguiram um padrão de distribuição para as variáveis analisadas nem quanto a redução para as caseínas e nem com relação ao aumento das proteínas do soro. Estes dados estão exibidos em gráficos nas Figuras 12 e 13.

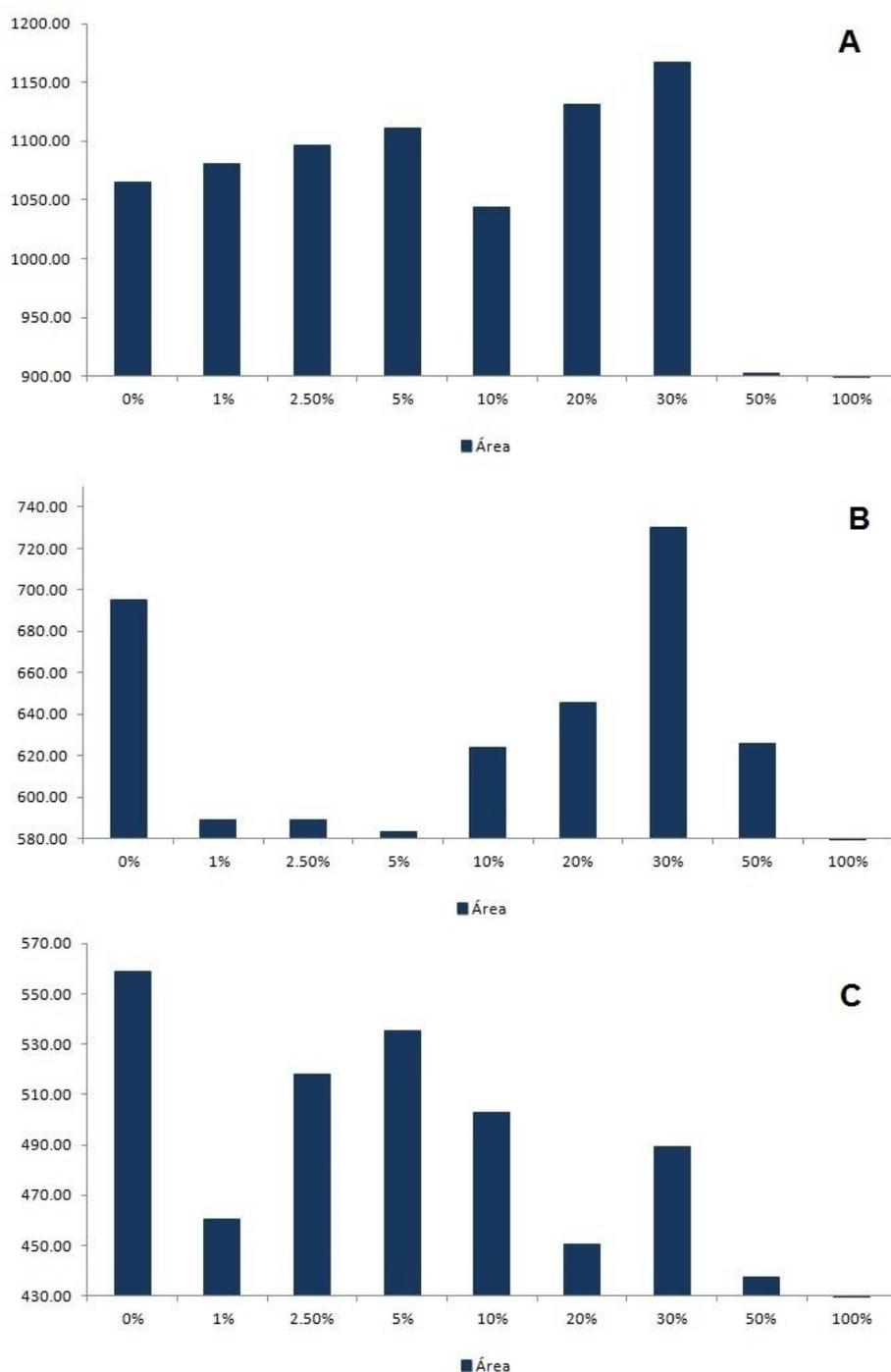


Figura 12 - Representação gráfica do comportamento da variável área das caseínas do leite em pó com adição de soro de queijo obtidas com a técnica SDS-PAGE. A: Demonstração da caseína alfa (α). B: Apresentação da caseína beta (β). C: Representação da caseína kappa (κ). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda. No eixo horizontal, estão distribuídos os níveis de adição de soro de queijo.

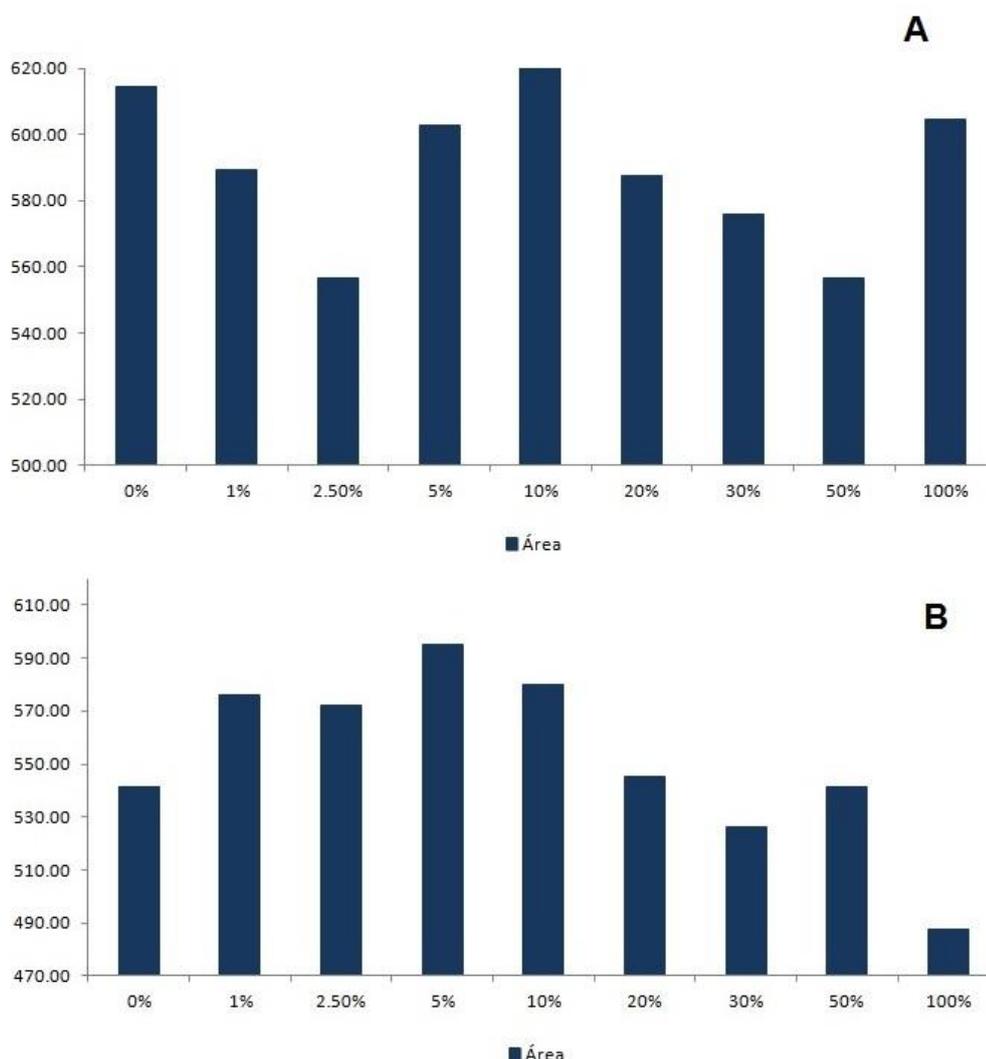


Figura 13 - Representação gráfica dos valores de área das proteínas do soro das amostras de leite em pó com adição de soro de queijo em níveis crescentes obtidos pela técnica SDS-PAGE. Em A está demonstrada a proteína do soro β -LG (beta lactoglobulina). Em B está apresentada a proteína do soro α -LA (alfa lactoalbumina). A barra vertical indica o valor de área, a qual está expressa pelos números do eixo vertical, à esquerda. No eixo horizontal, estão distribuídos os níveis de adição de soro de queijo.

Considerando que os resultados encontrados com a análise dos géis pelo software *ImageQuant TL* foram semelhantes para os quatro tipos de leite com adição de soro de queijo testados neste estudo, conclui-se que através das variável analisada não foi possível a identificação da fraude pela adição de soro de queijo com a técnica SDS-PAGE, já que não houve relação entre a quantidade de soro acrescentada. No entanto, as proteínas do leite ficaram muito bem dispostas nos géis SDS-PAGE, como pode ser visualizado na Figura 14, confirmando a eficácia da técnica para esta função.

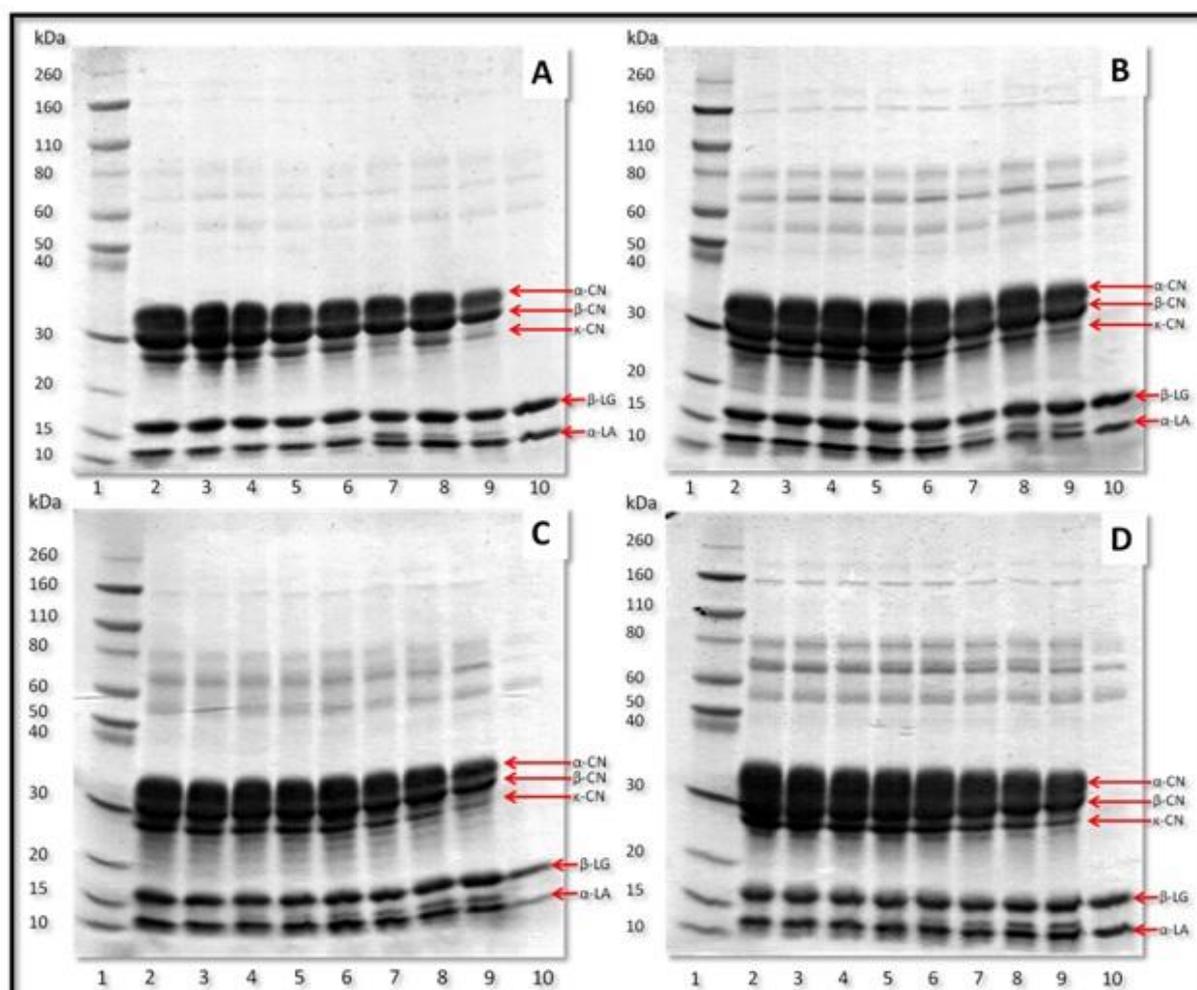


Figura 14 - Perfil eletroforético SDS-PAGE das proteínas do leite. A, B, C e D – amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó fraudadas com soro, respectivamente. 1 – marcador molecular *NovexProtein*; Os valores de 10 a 260 correspondem aos valores do marcador molecular em kDa. Adição de soro: 2 – 0%; 3 – 1%; 4 – 2,5%; 5 – 5%; 6 – 10%; 7 – 20%; 8 – 30%; 9 – 50%; 10 – 100%. As setas indicam as principais proteínas do leite.

Os resultados dessas análises permitiram a detecção da fraude por adição de soro de queijo ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) a partir da análise quantitativa dos valores de área do pico das proteínas, α -CN, obtidos pela técnica *lab-on-a-chip*, comportamento este, diferente daquele demonstrado para as mesmas amostras no método SDS-PAGE. Esta última técnica, por sua vez, foi eficiente na separação e quantificação da massa molecular das proteínas, como pode ser observado na figura 14.

Nas Tabelas 18 e 19 está representada a comparação entre os resultados obtidos pelas técnicas *lab-on-a-chip* e SDS-PAGE, respectivamente.

Tabela 18– Comparação dos níveis de adição de soro de queijo entre os tipos de leite a partir da análise da variável área de cada proteína obtida com a técnica *lab-on-a-chip*

| Tipo de leite | Variável analisada | Níveis de adição de soro de queijo | | | | |
|---------------|--------------------|------------------------------------|-------------|--------------|-------------------|--------------|
| | | Caseínas | | | Proteínas do soro | |
| | | α -CN | β -CN | κ -CN | β -LG | α -LA |
| Cru | Área | 1% | 1% | 10% | - | - |
| Pasteurizado | | 1% | 1% | 5% | - | - |
| UHT | | 1% | 1% | 2,5% | - | - |
| Em Pó | | 1% | 1% | 2,5% | - | - |

Legenda: - Não foi possível a identificação da adulteração em nenhum nível de adição de soro de queijo.

Tabela 19 – Comparação dos níveis de adição de soro de queijo entre os tipos de leite a partir da análise das variáveis área e porcentagem total de cada proteína obtida com a técnica SDS-PAGE

| Tipo de leite | Variáveis analisadas | Níveis de adição de soro de queijo | | | | |
|---------------|----------------------|------------------------------------|-------------|-------------------|-------------|--------------|
| | | Caseínas | | Proteínas do soro | | |
| | | α -CN | β -CN | κ -CN | β -LG | α -LA |
| Cru | Área | - | - | - | - | - |
| Pasteurizado | Área | - | - | - | - | - |
| UHT | Área | - | - | - | - | - |
| Em Pó | Área | - | - | - | - | - |

Legenda: - Não foi possível a identificação da adulteração em nenhum nível de adição de soro de queijo, a partir da análise da variável área das proteínas do leite.

Considerando as tabelas acima observa-se que a técnica SDS-PAGE não apresentou reprodutibilidade nos resultados para as variáveis analisadas. O nível de adição de soro de queijo no qual a técnica foi capaz de identificar adulteração foi de 20% demonstrada, somente, pela proteína κ -CN, o que implica dizer que a sensibilidade da técnica foi baixa para as condições deste experimento. Este é um valor considerado alto quando se compara com os resultados encontrados pelo uso do método *lab-on-a-chip*, o qual foi capaz de detectar a fraude por meio da adição de soro de queijo de forma semelhante para os quatro tipos de leite testados.

6. DISCUSSÃO

O método *lab-on-a-chip* foi capaz de detectar a fraude dentro das condições empregadas no experimento, enquanto que a técnica SDS-PAGE foi eficiente apenas para a separação e quantificação das proteínas do leite.

Marques e colaboradores (2011) também obtiveram sucesso utilizando SDS-PAGE para separação das proteínas para amostras de leite e soro em pó, quando avaliadas separadamente. Em contrapartida, ao analisar misturas dessas amostras visando a detecção de fraude em leite por meio da adição de soro, os resultados não foram satisfatórios, pois a técnica SDS-PAGE não foi capaz de estabelecer uma correlação entre a quantidade de soro adicionada. Este resultado foi similar ao obtido neste estudo, onde a fraude em leite pela adição de soro não foi identificada a partir da eletroforese em SDS-PAGE.

Entretanto, resultados contrários foram obtidos por Aquino (2013) em seu trabalho, o qual detectou a adulteração em amostras de leite cru adulteradas experimentalmente com soro de queijo pelo método SDS-PAGE. A partir da análise qualitativa, foi verificada alteração da intensidade das bandas proteicas α -s1CN, β -CN e β -LG, além da análise dos valores de suas concentrações por *software* específico.

Alterações quanto a intensidade da banda proteica no gel SDS não foram representativas neste trabalho. Houve uma leve redução da intensidade da banda da proteína κ -CN nas amostras de leite cru a partir de 5% de adição de soro. Nos outros tipos de leite analisados pasteurizado, UHT e em pó, a intensidade da banda começou a ser reduzida a partir de 20% de adição, como pode ser observado ainda na Figura 14.

Este mesmo nível de detecção foi encontrado por Siqueira e colaboradores (2000) em seu estudo com misturas de leite cru e soro em pó, no qual a análise qualitativa do gel de SDS foi percebido aumento da intensidade da banda de proteína correspondente a α -LA. Contudo, não foi notada diferença representativa na mesma banda proteica à medida que a proporção de soro foi aumentada. Entretanto, com base em análise densitométrica, os autores concluíram que houve correlação entre as caseínas e as proteínas do soro, e que assim a técnica SDS-PAGE foi eficaz para identificação e quantificação da adulteração em produtos lácteos a partir da adição de soro de queijo.

Em outro trabalho visando a detecção de adulteração em leite, porém a partir da mistura de leite de vaca e leite de cabra, foi identificada a fraude com 2,5% de adição de leite de vaca utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de ureia (UREIA-PAGE). Ao usar o SDS-PAGE, os autores concluíram que o método não foi capaz de detectar a fraude em leite de cabra. Contudo com o resultado, sugeriram que poderia ser eficiente na identificação de fraude em leite de égua ocasionada pela incorporação de leite de cabra ou de vaca, devido a diferença de migração das caseínas β e κ (EGITO et al., 2006).

Fraudes ocasionadas pela mistura de leite de diferentes espécies animais são comuns, principalmente pelos altos valores atribuídos aos leites de cabra, búfala, ovelha, camela, égua entre outros animais devido as características nutricionais do leite e também porque esses animais são criados em menor escala quando comparados as vacas. Em outro estudo, por exemplo, no qual foram avaliadas misturas de leite de espécies diferentes, os resultados encontrados ao utilizar UREIA-PAGE, indicaram adulteração em leite de cabra a partir de 2% de adição de leite de vaca, sendo a α -CN bovina, a proteína determinante para a identificação da fraude devido sua migração na corrida eletroforética ter sido mais rápida e com boa resolução na separação das bandas proteicas; já a técnica SDS-PAGE, os resultados foram satisfatórios apenas para a separação e quantificação das proteínas do leite (MEURER, 2014). Estes dados apontados para a técnica SDS-PAGE coincidem com os resultados observados neste presente trabalho, onde a fraude promovida pela adição de soro não foi detectável para a mesma metodologia empregada para todas as amostras testadas, sendo eficiente apenas, para a separação das bandas proteicas.

Por sua vez, Galindo-Amaya; Valbuena-Colmenares e Rojas-Villaruel (2006) obtiveram uma resposta razoável ao empregar a eletroforese em SDS-PAGE visando a identificação do componente indicador de fraude em leite a partir da adição de soro, o CMP. Ao analisarem amostras de leite cru, soro doce e soro ácido, eles detectaram uma banda de proteína com massa molecular de aproximadamente 20,9 kDa que distinguia de qualquer outra proteína conhecida, além de ter ocorrido somente nas amostras de soro doce. E ainda, ao avaliarem as misturas de soro com leite cru, a mesma banda proteica foi evidenciada no gel com 1% de soro adicionado, sendo intensificada com o aumento da proporção de soro para 5, 10 e 50%. Com base nesses resultados, eles concluíram então, que se tratava do CMP, e

que conseqüentemente, a técnica SDS-PAGE poderia ser aplicada em casos de fraude em leite a partir de sua mistura com soro de queijo.

Resultados equivalentes foram observados no trabalho de Gasparetto (2007), no qual avaliou amostras de leite pasteurizado fraudado com soro de queijo. Neste experimento, foi identificada uma banda de proteína com aproximadamente 20,9 kDa para a amostra com 5% de adição de soro com análise eletroforética em SDS-PAGE. Esta banda proteica teve sua intensidade acentuada de acordo com o aumento da proporção de soro adicionada, o que se concluiu que essa banda, possivelmente, seria um indicativo de adulteração provocada pela adição de soro.

Fraude em leite a partir da adição de soro de queijo com o uso da técnica SDS-PAGE foi relatada também por Vilela (1987). Em seu estudo, foram analisadas amostras de leite pasteurizado com 0,5; 1 e 1,5% de soro previamente tratadas para que o CMP fosse detectável. Como resultado, a banda proteica possivelmente correspondente ao CMP, foi identificada nas amostras com o menor limite de detecção, ou seja, 0,5% de adição de soro de queijo, concluindo que o método utilizado foi capaz de identificar a fraude dentro das condições da pesquisa.

Em outro estudo onde foram avaliadas amostras comerciais de leite em pó integral e desnatado na cidade do México, a fraude foi detectada em 14,81% das amostras avaliadas a partir da identificação do CMP pela técnica SDS-PAGE. Isto representa que houve ação fraudulenta em 16 de um total de 108 amostras utilizadas no experimento, além de ser considerado um resultado alarmante, por se tratar de marcas comerciais que não foram previamente tratadas com a simulação de fraude (BETANCOURT et.al., 2000).

Resultados a partir da identificação do CMP são frequentes para estudos onde se objetiva a detecção de fraude por meio da adição de soro de queijo, visto que esse componente está presente somente no soro. No entanto, SDS-PAGE não é a técnica mais recomendada para este tipo de análise, mesmo embora tenha sido capaz de separar a banda de proteína em muitas pesquisas. Não se tem uma banda proteica clara, e por isso, os resultados podem gerar dúvidas. Técnicas mais sensíveis são sugeridas, como HPLC, cuja inclusive é a técnica oficial do MAPA no Brasil (BRASIL, 2006). Outra questão que pode influenciar nos resultados está relacionada a origem do CMP, que pode ser formado a partir da ação de microrganismos psicrófilos e não necessariamente pela coagulação ocasionada pela renina/quimosina.

Entretanto, para análise de fraudes em leite, é sempre viável a busca por metodologias mais simples e mais baratas, como é o caso do SDS-PAGE comparado a técnica de HPLC. Além disso, eletroforese em SDS é um método bastante utilizado devido sua eficiência na separação e quantificação das proteínas do leite e tem sido empregada com sucesso em avaliações de fraude em leite a partir da mistura de leite de diferentes espécies animais (VELOSO, 2002).

Por esses motivos, metodologias alternativas são pesquisadas e estudadas continuamente e a técnica *lab-on-a-chip* retrata o avanço da tecnologia frente às exigências do mercado, onde métodos viáveis financeiramente e que ofereçam maior facilidade de execução são predominantes. O método eletroforético *lab-on-a-chip* tem sido utilizado para separação e quantificação de proteínas até mesmo de DNA e RNA (ANEMA, 2009; WU, QIN e LIN, 2008; HEY, 2007; JEONG et al., 2005; GOETZ et al., 2004).

No caso da análise de proteínas, a técnica *lab-on-a-chip* tem sido aplicada devido a sua equivalência ao método de eletroforese em SDS-PAGE, porém trata-se de uma eletroforese na sua forma automatizada, proporcionando a análise de um número de amostras em um período de tempo bastante inferior, 30 minutos, além de utilizar pouca quantidade de amostras e reagentes menos tóxicos, quando comparado a técnica SDS-PAGE (ANEMA, 2009).

Perante as vantagens que a eletroforese *lab-on-a-chip* oferece, Anema (2009) em seu estudo com amostras de leite desnatado fresco e proteínas padrão do leite individuais, avaliou os perfis eletroforéticos obtidos nessa técnica com a finalidade de determinar se esta, demonstra potencial para a separação das proteínas do leite. Para efeito de comparação com um método já estabelecido para as amostras empregadas, o autor ainda submeteu as mesmas amostras à eletroforese em SDS-PAGE. Nesse experimento em questão, o resultado indicou uma adequada separação das proteínas do leite, principalmente para as proteínas do soro, as quais tiveram seus tempos de migração assemelhados com aqueles das proteínas padrão, o que sugere que a técnica *lab-on-a-chip* foi bem sucedida na separação dessas proteínas.

Ainda de acordo com Anema (2009), quando comparadas as metodologias de eletroforese *lab-on-a-chip* e SDS-PAGE, as proteínas do soro β -LG e α -LA e as proteínas do leite α e β -CN apresentaram valores de massa muito próximos, reforçando a ideia de que a eletroforese em *chip* pode ser facilmente utilizada como

técnica alternativa ao SDS-PAGE. No entanto, caseína κ foi a única proteína em que apresentou valor de massa molecular muito distante, praticamente o dobro para a metodologia *lab-on-a-chip*, quando comparados os dois métodos aplicados. Este efeito sobre a κ -CN parece ter relação com mecanismos próprios da eletroforese em *chip*, ou ainda, pode estar relacionado com a glicosilação, padrão de fosforilação e característica de hidrofobicidade da κ -CN, que altera sua estrutura e conseqüentemente age na interação com o gel matriz durante separação (NITSCHE, 2011).

O uso da técnica *lab-on-a-chip* foi empregada com êxito na identificação, separação e caracterização das proteínas do soro de leite de búfala, onde o resultado obtido foi uma separação rápida das proteínas β -LG e α -LA, com massas moleculares próximas as relatadas na literatura com o método SDS-PAGE, o que conseqüentemente, chegaram a conclusão que essa técnica é apropriada para avaliações que demandam rapidez como por exemplo, em atividades rotineiras (BUFFONI, 2011), como um laboratório de controle de qualidade de uma indústria.

Em outro trabalho, cujo objetivo foi avaliar a influência da lactação em leite de burra doméstica, a eletroforese *lab-on-a-chip* foi aplicada apenas para caracterização e separação das proteínas do leite, onde os resultados para a massa molecular foram equivalentes aos valores de massa obtidos na literatura existente, demonstrando mais uma vez a especificidade da técnica para a separação e quantificação das proteínas do leite (GUBIC et al., 2015).

Dentro desse contexto, é perceptível que o método de eletroforese *lab-on-a-chip* proporciona resultados concretos quanto a separação e quantificação das proteínas do leite, e que é bastante utilizado em muitos estudos com esta finalidade. A partir disso, Furtado (2011), testou amostras de leite pasteurizado, soro de queijo e suas misturas nas proporções 5, 10, 15 e 25% com o objetivo de identificar a fraude em leite ocasionada pela adição de soro de queijo. Os resultados preliminares foram inconclusivos, mesmo que embora tenha sido observada a presença de um pico proteico característico, que sugere ser o CMP, para a amostra com 5% de adição de soro de queijo.

No trabalho de Santos e demais coautores (2013) fraude em leite cru por meio da adição de soro de queijo foi detectada nas amostras a partir de 1% de adição, com base nas análises das concentrações das caseínas α e β obtidas pela corrida eletroforética em *lab-on-a-chip*. Resultado este, similar ao encontrado neste

experimento para os 4 tipos de leite (cru, pasteurizado, UHT e em pó) testados com simulações de fraude, onde a fraude foi encontrada também a partir do menor limite de detecção, 1% de adição de soro de queijo.

Já Meurer (2014) em seu estudo com a técnica *lab-on-a-chip* que objetivou a detecção de fraude em leite de cabra provocada pela adição de leite de vaca, encontrou resultados insatisfatórios dentro das condições impostas no experimento, pois a fraude no leite de cabra foi identificada com o limite mínimo de detecção de 20% de adição de leite vaca, constatada pela presença da α 1-CN. Resultado idêntico foi encontrado por Jesus (2013) onde também avaliou amostras com simulações de fraude a partir da adição de leite de vaca.

Como pode-se notar os resultados que visam a identificação de fraudes em leite, sejam elas pela incorporação de soro ou leite de outras espécies de animais são diversificados. Mas isso pode ter várias razões, como por exemplo, a preparação das amostras de modo que as tornem identificáveis dentro do limite de detecção do método que será empregado para tal detecção. Contudo, a partir desses resultados e levando em consideração as vantagens que a técnica *lab-on-a-chip* proporciona, é viável o aprimoramento de pesquisas envolvendo os produtos lácteos com o uso desse método.

7. CONCLUSÃO

- Concluiu-se que as principais proteínas do leite α , β e κ caseínas bem como das proteínas do soro β -LG e α -LA exibiram comportamento semelhante para os quatro tipos de leite analisados com a técnica *lab-on-a-chip*: as caseínas tiveram seus valores de área do pico proteico reduzidos à medida que o nível de soro aumentou; e as proteínas do soro, não apresentaram valores de área uniformes nem com relação ao seu aumento e nem redução;
- Somente o método *lab-on-a-chip* evidenciou fraude a partir de 1% de adição de soro de queijo, através do comportamento exibido pela α -CN, em todos os tipos de leite testados. Este resultado pode tornar o método *lab-on-a-chip* como uma técnica de triagem na rotina de laboratórios visando facilitar a identificação da fraude em leite por adição de soro de queijo;
- O método de eletroforese SDS-PAGE não foi capaz de identificar a fraude provocada pela adição de soro de queijo nos leites cru, pasteurizado, UHT e em pó;
- As duas técnicas empregadas, SDS-PAGE e *lab-on-a-chip*, foram capazes de separar as bandas das proteínas do leite de forma eficaz. E esse padrão foi semelhante para os quatro tipos de leite analisados: cru, pasteurizado, UHT e em pó.
- As massas moleculares das proteínas dos leites cru, pasteurizado, UHT e em pó foram comparáveis entre as duas técnicas empregadas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o resultado para o método *lab-on-a-chip* tenha sido satisfatório neste estudo, a literatura encontrada oferece resultados muito variáveis, o que implica em dizer, que a metodologia ainda precisa de aprimoramento para ser validada e assim, tornar o seu uso prático na rotina de laboratórios de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, Maria Rociene; CAMPÊLO, Carla da Silva; SILVA, Jean Berg Alves. Fraude em leite: métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.73, n.3, p. 244-251, 2014.

ALMEIDA, Cristine Couto et al. Proteína do soro de leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1840-1854, 2013.

ANEMA, Skelte 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.

AQUINO, Letícia Fraga Matos Campos. **Estudo da fraude com soro de queijo em leite através das metodologias de ácido siálico livre, eletroforese SDS-PAGE e análise sensorial**. 2013. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2013.

BETANCOURT, Silvia D. Peña et al. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración com suero de quesería em leche deshidratada. **Veterinária México da Universidade Autónoma de México, Distrito Federal, México**, v. 31, n. 3, p. 217-222, México, jul/set. 2000.

BOSCHI, Jaqueline Rodrigues. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, departamento de engenharia química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1823, de 18 de dezembro de 1950 e a Lei nº 7889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 30 de mar. 2017. Seção 1, p. 3-27.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dez. de 2011. Altera o caput, exclusão do parágrafo único com inserção dos parágrafos 1º ao 3º; altera os anexos I, IV, V e VI e revoga os anexos II e III da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 30 de dez. 2011. Seção 1, p. 6-11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07, de 02 de mar. de 2010. Aprova o Método Oficial de Determinação de CMP (caseinomacropéptido) em leite, por HPLC, Eletroforese Capilar e Espectrometria de Massas em leite, em apresentações integrais, semidesnatadas e desnatadas, tratados por processos de UHT ou pasteurização. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 03. Mar. 2010. Seção 1, p. 1-3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dez. de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 14. Dez. 2006. Seção 1, p. 8-30.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 16, de 23 de ago. de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2005. Seção 1, p. 7-10.

BUFFONI, Joanna Natália et al. Characterization of the major whey proteins form milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Food Chemistry**, v. 127, p. 1515-1520, fev. 2011.

CARVALHO, Bruna Mara Aparecida et al. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **RedVet Revista eletrônica de veterinária**. v. 8, n. 6, p. 1695-7504, jun. 2007.

CHUST, Rafael Berbert. Introdução à cromatografia de líquidos (HPLC). **Boletim SPQ**, v. 39, p. 49-53, 1990.

COSTA, Fabiano Freire et al. Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1666-1673, 2014.

FARREL JR, H. M et al. Nomenclature of the Proteins of Cow's Milk – Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.

FILHO, João R. de Freitas et al. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns – PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 2, p. 38-46, 2009.

FOX, Patrick F.; MCSWEENEY, Paul L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. In: Milk proteins. London: Blackie Academic, 1998. p. 147-238.

FURTADO, Marco Antônio Moreira et al. The use “lab-on-a-chip” electrophoresis technology to detect whey added to milk as a fraud. In: SummilK IDF World Dairy Summit 2011, 2011, Parma - Itália. Proceedings..., 2011.

GALINDO-AMAYA, Luz Mila; VALBUENA-COLMENARES, Emiro; ROJAS-VILLARROEL, Evelin. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Revista Científica da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade de Zulia, Maracaibo**, Venezuela, v. 16, n. 3, p. 308-314, 2006.

GARCÍA-OTERO, Natália et al. Study of extraction procedures for protein analysis in plankton samples by OFFGEL electrophoresis hyphenated with Lab-on-a-chip technology. **Talanta**, v. 115, p. 631-641, jun, 2013.

GASPARETTO, Carolina Miranda. **Padronização de metodologia analítica aplicável à detecção de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado**. 2009. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2009.

GUBIC, Jasmine et al. Characterization of several milk proteins in Domestic Balkan donkey breed during lactation, using lab-on-a-chip capillary electrophoresis. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quartely**, v. 22, n. 1, p. 9-15, 2015.

HARAGUCHI, Fabiano Kenji.; ABREU, Wilson César; DE PAULA, Hebert. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, jul/ago, 2006.

HEY, Julie S. Advances in microscale protein fractionation and analysis. **American Laboratory**, v. 25, p. 12-16, jan. 2007.

HOLT, C. et al. Invited review: caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6127-6146, out. 2013.

HUPPERTZ, Thom et al. High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 58-66, mai. 2006.

JEONG, Sang et al. An automated alternative to SDS-PAGE for protein analysis. **American Laboratory**, v. 23, p. 8-10, 2005.

JESUS, Débora Cristina. **Uso da tecnologia de eletroforese lab-on-a-chip em leite caprino com adição de leite bovino**. 2013. (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

MAGALHÃES, Mirella Araújo. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrofotometria de massa.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

MAGENIS, Renata Bongioiolo. **Avaliação das propriedades físico-químicas, reológicas e do perfil eletroforético por SDS-PAGE de queijo minas frescal.** 2015. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de ciências agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

GE Healthcare. **2-D Electrophoresis, Principles and Methods**, set. 2004, 162 p.

MALORNY, Burkhard et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MEURER, Vaneida Maria. **Estudo comparativo entre as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida ureia-page e lab-on-a-chip para detecção de fraude em leite de cabra pela adição de leite bovino.** 2014. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2014.

MOORE, Jeffrey C. et al. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 330-357, 2010.

NELSON, David L; COX, Michael M. Lehninger **Principles of Biochemistry**. 4. Ed. W.H. Freeman, Ltd. 2004. 1130 p.

NITSCHKE Rainer. Milk protein analysis with the Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent Protein 80 kit. **Agilent Technologies**, p. 1-7, jun, 2011.

OLIEMAN, C; HOOYDONK, A. C. M. A rapid and sensitive high performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. **International Dairy Journal**, v. 36, p. 153-158. 1982.

OLIVEIRA, Débora F.; BRAVO, Cláudia E. C.; TONIAL, Ivane B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64-71, mar./abr. 2012.

OLIVEIRA, Gislene Bremer et al. Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367-368, p. 56-65, mar/jun. 2009.

PATEL, Has Mukh A. et al. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Lait**, v. 87, p. 251–268, 2007.

PELLEGRINI, Luiz Gustavo. et al. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. **Revista Synergismus Scientifica UTFPR**, v. 7, n. 1, 2012.

PRATA, Luiz Francisco; PRATA, Camila Barbieri. Determinação de GMP e CMP* no leite por métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – Parâmetros metodológicos, (*Glicomacropéptido e Caseinomacropéptido). **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 2, p. 29-39, 2012.

RASMUSSEN, Lone K. et al. Disulphide-linked caseins and casein micelles. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3-6, p. 215-218, mar. 1999.

REIS, Abel Mário et al. Efeito do grupo racial e do número de lactações sobre a produtividade e composição do leite bovino. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 3421-3436, 2012.

ROCHA, Thales Lima et al. **Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Comunicado Técnico, n. 136, Brasília, DF, out, 2006.

ROJAS, Evelin V. et al. Aislamiento y rendimiento del GMP mediante precipitación de lactosuero com ácido tricloroacético. **Revista Científica da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade de Zulia, Maracaibo**, Venezuela, v. 19, n. 3, p. 295-302, 2009.

SANTOS, Alessa Siqueira Oliveira Santos et al. Análise eletroforética microfluídica “*lab-on-a-chip*” das proteínas do leite para detectar adulteração de leite bovino adicionado com soro. **Revista Veterinária e Zootecnia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP**, Botucatu, v. 20, n. 2, p. 114-115, jun. 2013.

MARQUES, Felipe Macedo et al. Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 473-479, 2011.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan/mar. 2005.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, out/dez, 2004.

SILVA, Danilo José. **Resíduos na indústria de laticínios**. Série sistema de gestão ambiental – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

SILVA JÚNIOR, José Godinho. **Eletroforese de proteínas**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125 p.

SIQUEIRA, Egle Machado de Almeida et al. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, Campinas, set/dez. 2000.

TULLIO, Lindamir Tomczak. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

VELOSO, Ana Cristina A. et al. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n.4, p. 609-615, 2002.

VILELA, S. C. **Detection de suero de queseria agragado a leche pasteurizada y leche em polvo, por determinacion del glicomacropéptido por eletroforesis**. 1987. Dissertação (Mestrado) – Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, 1987.

WANDERLEY, Carolina Hood et al. Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido. **Revista de Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 54-63, jan./jun. 2013.

WARREN, Leonard. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 234, n. 8, p. 1971-1975, ago. 1959.

WOLFSCHOON-POMBO, Alan F; PINTO, Anna Paola. E. F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n. 2, p. 111-115, fev. 1985.

WU, Dapeng; QIN, Jianhua.; LIN, Bingcheng. 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, nov. 2007.