Faculdade de Farmácia
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado em Controlo de Qualidade

ANÁLISE DAS CASEÍNAS DE LEITE E QUEIJOS POR HPLC/UV E POR UREIA-PAGE

Ana Cristina Araújo Veloso

PORTO
2001

Faculdade de Farmácia

UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado em Controlo de Qualidade

ANÁLISE DAS CASEÍNAS DE LEITE E QUEIJOS POR HPLC/UV E POR UREIA-PAGE

Ana Cristina Araújo Veloso

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/09/18
Reg. 1524
Cota

FFM
VEL

PORTO

2001

ANÁLISE DAS CASEÍNAS DE LEITE E QUEIJOS POR HPLC/UV E POR UREIA-PAGE

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade na área da especialidade Água e Alimentos.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Bioquímica e Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e no Laboratório de Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

Sob a orientação de:
Prof. Doutora Isabel M.P.L.V.O. Ferreira

Co-orientação de:
Prof. Doutora Natércia Teixeira
Prof. Doutora Margarida Alice Ferreira

RESUMO

Neste trabalho implementaram-se duas metodologias analíticas: HPLC em fase reversa, com coluna Chrompack P300 RP (contendo um polímero de poliestireno divinilbenzeno), detecção a 280 nm e eluição por gradiente com mistura de TFA/água/acetonitrilo; e a electroforese em gel de poliacrilamida com ureia. Avaliou-se a sua aplicabilidade na análise quantitativa e/ou qualitativa das caseínas de leite de vaca cru e processado, leite cru de ovelha e de cabra, em queijos de ovelha e de vaca preparados pela mesma tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho e de queijos comerciais. Procedeu-se ainda à pesquisa de adulterações de leite de vaca em leite de ovelha e de cabra, e em queijos de ovelha tipo Terrincho.

A metodologia de HPLC foi validada para o leite de vaca. Nos ensaios de recuperação os resultados variaram entre 91 e 100%. Na avaliação da precisão o coeficiente de variação foi inferior a 3,67% para análises no mesmo dia e 4,46% em dias diferentes. Verificou-se linearidade no intervalo de concentrações de 0,038 a 0,377, de 0,188 a 1,883 e de 0,151 a 1,506 mg/ml para as κ, α e β-caseínas, respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,006, 0,019 e 0,015 mg/ml para essas caseínas. Obtiveram-se diferentes perfis cromatográficos para as caseínas dos três tipos de leite quando analisados individualmente. No entanto, para misturas verificou-se que era mais fácil detectar a presença de leite de vaca em leite de cabra do que em leite de ovelha. Com efeito, no primeiro caso foi possível detectar uma adulteração de 5%, sendo promissora a possibilidade de quantificação.

Conseguiu-se uma boa resolução das várias caseínas por electroforese. As caseínas de leite de vaca, ovelha e cabra apresentaram perfis diferentes, exibindo a α-caseína bovina maior mobilidade do que a ovina e a caprina. Foi possível detectar adulterações de 5% de leite de vaca em leite de ovelha e de 2% em leite de cabra.

A análise da proteólise dos queijos foi mais eficiente por electroforese do que por HPLC. Ambas as técnicas permitiram identificar adulterações em queijos de ovelha tipo Terrincho. Contudo, por electroforese foi possível detectar adulterações de 10%, enquanto que por HPLC apenas foi possível para 20% de adulteração, durante 30 dias de maturação.

ABSTRACT

Two analytical methodologies are described in this work: reversed-phase HPLC on a Chrompack P300 RP column (with polystyrene divinylbenzene polymer), detection at 280 nm and gradient elution with a mixture of TFA/water/acetonitrile; and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Its applicability on the quantitative and qualitative analysis of cow's, ewe's and goat's caseins of raw and processed milks, and on ewe's and cow's cheeses manufactured according the Terrincho's cheese technology and commercial cheeses, was evaluated. In addition it was investigated the adulteration of ewe's and goat's milk as well as the Terrincho's ewe cheeses with cow's milk.

The validity of the HPLC method was verified for cows' milk. For the recovery studies the values ranged between 91 and 100%. In the evaluation of the precision, the variation coefficient was less than 3.67% for analysis made on the same day and 4.46% for different days. The linearity was maintained over the concentration range 0.038 to 0,377, 0.188 to 1.883 and 0,151 to 1,506 mg/ml for κ, α and β-caseins, respectively. The detection limits values were 0.006, 0.019 and 0.015 mg/ml, respectively. Different chromatographic profiles were obtained for the three types of milk caseins, when analysed individually. However, for mixtures it was shown that it was easier to detect the presence of cow's milk in goat's milk than in ewe's milk. Indeed, in the former it was possible to identify an adulteration of 5%, and it seems promising the possibility of quantification.

By electrophoresis it was obtained a good resolution for the different types of caseins. Depending on its origin (cow, goat and ewe) they presented a different electrophoretic profile, showing the cow's α-casein a higher mobility than the casein from goat and ewe. It was possible to detect 5% and 2% adulterations of cow's milk respectively in ewe's and goat's milk.

The study of proteolysis was more efficient by electrophoresis than by HPLC. Both techniques allowed to identify adulterations in Terrincho's cheese type. Nevertheless, by electrophoresis it was possible to detect 10% adulterations, while for HPLC it was only possible for 20% adulteration, during the 30 days of ripening.

- À Prof. Doutora Isabel Ferreira, minha orientadora, gostaria de agradecer a amizade, sugestões, apoio e incentivo que me dispensou ao longo da realização deste trabalho.

- À Prof. Doutora Natércia Teixeira, pela co-orientação desta dissertação, pela sua capacidade científica, pelo seu acolhimento, apoio e interesse que contribuíram para a realização deste trabalho.

- À Prof. Doutora Margarida Ferreira, co-orientadora desta dissertação, pelos conhecimentos transmitidos e pela sugestão do tema da dissertação que se apresenta.

- Ao Dr. Álvaro Mendonça, pela constante disponibilidade e valioso contributo prestado no decorrer deste trabalho, nomeadamente, na obtenção do leite de ovelha "Terrincha" e no fabrico dos queijos tipo Terrincho.

- A todas as pessoas do Laboratório de Bioquímica, pela forma como me acolheram e se mostraram disponíveis para me ajudar durante o tempo que aí passei. De entre todos, quero realçar a Prof. Doutora Georgina, o Luís e a Dona Emília.

- Ao laboratório de Bromatologia, na pessoa da Prof. Doutora Beatriz Oliveira, gostaria de agradecer as condições disponibilizadas para a concretização deste trabalho.

- À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança o meu agradecimento pelas facilidades e ajudas sempre concedidas.

- À Susana Casal pela disponibilidade, sugestões e amizade com que sempre me ouviu e acolheu.

- À Olívia Pinho, por todos os momentos partilhados durante a realização deste trabalho, pela amizade, entusiasmo e sorriso contagiante.

- À Branca, à Inês e à Paula, minhas colegas de mestrado, pela ajuda e todo o apoio.

- Aos meus amigos, Isabel, Carla, Luís, Rui e Paulo pelo apoio incondicional e entusiasmo, o meu muito obrigada.

- Ao António, pela cumplicidade, força, coragem e entusiasmo que me incutiu desde os primeiros dias e pela presença nos momentos mais difíceis que não foram poucos.

- Aos meus Pais e irmã, pelo apoio, compreensão e paciência que me dedicaram ao longo deste trabalho, de uma forma tão unívoca e incondicional.

- Às pessoas que de uma ou outra forma me ajudaram a tornar este momento possível.

ÍNDICE GERAL

Pag.

ÍNDICE DE TABELAS viii

ÍNDICE DE FIGURAS x

ABREVIATURAS xii

INTRODUÇÃO GERAL 1

1. INTRODUÇÃO 4

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E COMPOSIÇÃO PROTEICA DO LEITE 5

1.1.1. Proteínas lácteas 10

1.2. O QUEIJO E PRINCÍPIOS GERAIS DA PROTEÓLISE 22

1.3. CONTROLO DA QUALIDADE DOS LACTICÍNIOS 30

1.3.1. Métodos de cromatografia líquida 33

1.3.2. Métodos electroforéticos 36

1.4. OBJECTIVOS 39

2. MATERIAIS E MÉTODOS 42

2.1. AMOSTRAGEM 43

2.1.1. Fabrico dos queijos de acordo com a tecnologia de manufactura do Queijo Terrincho 43

2.1.2. Precipitação das caseínas 45

2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM FASE REVERSA 46

2.2.1. Padrões e reagentes 46

2.2.2. Equipamento 47

2.2.3. Optimização e validação do método para a separação, identificação e quantificação das caseínas de leite de vaca 48

2.2.4. Quantificação das caseínas de leite de vaca 51

2.2.5. Análise das caseínas de leite de ovelha, de cabra e de queijos 51

2.3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA 52

2.3.1. Padrões e reagentes 52

2.3.2. Equipamento 52

2.3.3. Optimização do método de separação das caseínas 53

2.3.4. Análise das caseínas dos queijos 54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
3.1. PRECIPITAÇÃO DAS CASEÍNAS 56
3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM FASE REVERSA 57
3.2.1. Optimização e validação do método para a separação, identificação e quantificação das caseínas de leite de vaca 57
3.2.2. Quantificação das caseínas de leite de vaca 66
3.2.3. Análise das caseínas de leite de ovelha, de cabra e de queijos 69
3.3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA 82
3.3.1. Optimização do método de separação das caseínas 82
3.3.2. Análise das caseínas dos queijos 86
3.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICA E ELECTROFORÉTICA 92
4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO 95
BIBLIOGRAFIA 99
APÊNDICES 115
APÊNDICE A – SOLUÇÕES USADAS NA ELECTROFORESE 116
APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE HPLC 119
APÊNDICE C – CURVA DE CALIBRAÇÃO: CASEÍNA OVINA 126

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1.1. – Composição média (%) de leites de vários mamíferos 6

Tabela 1.2. – Principais compostos da matéria azotada não proteica do leite 10

Tabela 1.3. – Classificação molecular das proteínas do leite 11

Tabela 1.4. – Propriedades físico-químicas das caseínas 17

Tabela 1.5. – Composição das fracções azotadas obtidas por diferentes métodos de extracção líquida e/ou precipitação 29

Tabela 2.1. – Quantidades de leite de vaca e ovelha e de coalho animal utilizadas no fabrico dos queijos tipo Terrincho 45

Tabela 3.1. – Tempos de retenção das diferentes fracções de caseína do leite de vaca: comparação entre padrões e amostras 59

Tabela 3.2. – Identificação dos picos das diferentes fracções de caseína de leite vaca pelo método da adição 62

Tabela 3.3. – Repetibilidade e reprodutibilidade do HPLC 63

Tabela 3.4. – Parâmetros das curvas de calibração determinados pelo método do padrão externo 63

Tabela 3.5. – Repetibilidade e reprodutibilidade do método 65

Tabela 3.6. – Ensaios de recuperação do método numa amostra de leite de vaca 66

Tabela 3.7. – Quantificação da caseína inteira de vaca e das respectivas fracções 66

Tabela 3.8. – Teor de caseína em leite de vaca: comparação entre os valores experimentais obtidos neste estudo e os obtidos por Walstra e Jenness (1984) e por Bobe *et al.* (1998) 67

Tabela 3.9. – Parâmetros da curva de calibração determinados pelo método do padrão externo 75

Tabela A.1. – Composição dos géis de concentração e de corrida 118

Tabela B.1. – Ensaios de repetibilidade da técnica de HPLC 119

Tabela B.2. – Ensaios de reprodutibilidade da técnica de HPLC 120
Tabela B.3. – Ensaios de repetibilidade do método 121
Tabela B.4. – Ensaios de reprodutibilidade do método 122
Tabela B.5. – Caseína inteira bovina: valores utilizados para a curva de calibração .. 123
Tabela B.6. – α-caseína bovina: valores utilizados para a curva de calibração 123
Tabela B.7. – β-caseína bovina: valores utilizados para a curva de calibração 124
Tabela B.8. – κ-caseína bovina: valores utilizados para a curva de calibração 124
Tabela B.9. – Ensaios referentes à exactidão do método 125
Tabela C.1. – Caseína inteira ovina: valores utilizados para a curva de calibração ... 126

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1.1. – Composição físico-química do leite (valores médios) 5

Figura 1.2. – Estrutura do leite 7

Figura 1.3. – Aspecto dos glóbulos de gordura do leite 8

Figura 1.4. – Produção das γ-caseínas e proteose-peptona por proteólise da β-caseína 19

Figura 1.5. – Modelo de submicelas proposto por Walstra 21

Figura 1.6. – Diagrama tecnológico tradicional genérico para o fabrico de queijo .. 24

Figura 3.1. – Perfis cromatográficos das caseínas de leite de vaca, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 60

Figura 3.2. – Curvas de calibração obtidas para a caseína total, κ, α e β-caseínas bovinas 64

Figura 3.3. – Perfis cromatográficos da caseína inteira de leite de vaca, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 68

Figura 3.4. – Perfis cromatográficos da caseína inteira bovina, ovina e caprina, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 70

Figura 3.5. – Perfis cromatográficos da caseína inteira bovina e ovina, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 72

Figura 3.6. – Variação da área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'* com a percentagem de leite de vaca em leite de ovelha 72

Figura 3.7. – Perfis cromatográficos da caseína inteira bovina e caprina, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 73

Figura 3.8. – Variação da área relativa dos picos *'a'*, *'2'* e *'b'* com a percentagem de leite de vaca em leite de cabra 74

Figura 3.9. – Curva de calibração: área relativa do pico *'b'* em função da percentagem de leite de vaca em leite de cabra 74

Figura 3.10. – Curva de calibração obtida para a caseína ovina 75
Figura 3.11. – Perfis cromatográficos de caseínas de queijos ao longo da maturação, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 77
Figura 3.12. – Área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'*: variação com a maturação para os queijos de ovelha, vaca e ovelha adulterado 79
Figura 3.13. – Área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'*: variação consoante o grau de adulteração vaca/ovelha para o mesmo período de maturação, para os queijos de ovelha, vaca e ovelha adulterado 80
Figura 3.14. – Perfis cromatográficos de caseínas de queijos comerciais, obtidos por RP-HPLC a 280 nm 81
Figura 3.15. – Perfis de caseínas obtidos por ureia-PAGE 83
Figura 3.16. – Diagramas esquemáticos dos perfis de caseína obtidos por ureia-PAGE 83
Figura 3.17. – Perfis de caseínas obtidos para adulterações de leite vaca em leite de ovelha 85
Figura 3.18. – Perfis de caseínas obtidos para adulterações de leite vaca em leite de cabra 86
Figura 3.19. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de ovelha manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação 87
Figura 3.20. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de vaca manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação 88
Figura 3.21. – Perfis de caseínas obtidos para leites de diferentes espécies e para os queijos comerciais 89
Figura 3.22. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de ovelha com uma adulteração 10% de vaca, manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação .. 90
Figura 3.23. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de ovelha com uma adulteração 20% de vaca, manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação .. 91

ABREVIATURAS

AE	- permuta aniónica
área relativa	- área de cada pico/área total do cromatograma
α-la	- α-lactalbumina
BSA	- albumina do soro de vaca
β-lg	- β-lactoglobulina
CN	- caseína
CV	- coeficiente de variação
d.i.	- diâmetro interno
d.p.	- desvio padrão
DEAE	- dietilaminoetil
DOP	- denominação de origem protegida
DTT	- ditiotreitol
EDTA	- ácido etilenodiaminatetraacético
ESAB	- Escola Superior Agrária de Bragança
FIL	- Federação Internacional de Lacticínios
FPLC	- cromatografia líquida para separação de proteínas
GF	- exclusão molecular
HI	- interacção hidrofóbica
HPLC	- cromatografia líquida de alta pressão
p (%)	- percentagem mássica
P	- grupos fosfato
PCR	- reacção em cadeia de polimerase
PP	- proteose-peptona
r	- coeficiente de correlação
RP	- fase reversa
SDS	- dodecilsulfato de sódio

-SH	- grupos sulfridilo
-S-S-	- ligação dissulfureto
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
TFA	- ácido trifluoracético
TR	- tempo de retenção
UHT	- ultra pasteurizado
UREIA-PAGE	- electroforese em gel de poliacrilamida com ureia
UV/Vis	- ultra-violeta/visível

INTRODUÇÃO GERAL

O leite aparece na Biosfera com os primeiros mamíferos, há aproximadamente 500 milhões de anos. Apenas recentemente, há cerca de 10 mil anos, o Homem aprende a domesticar animais e a desenvolver práticas agrícolas, como mostram várias pinturas e esculturas espalhadas por várias localizações do globo. As primeiras referências históricas ao consumo de leite proveniente de animais domésticos aparecem na Mesopotânia, em Al-Ubaid, através de pinturas em baixo relevo (3200 a.c.), e de um fresco proveniente de uma Mastaba de Metete. As fêmeas mais utilizadas para produzir leite para consumo humano eram as vacas, búfalas, ovelhas, cabras e camelas, as quais continuam, hoje em dia, a ser usadas em várias partes do mundo.

O leite é secretado pelos mamíferos com o objectivo de nutrir, estimular o crescimento e fornecer protecção imunológica ao lactente através dos seus múltiplos constituintes. Este produto tem vindo a ser consumido pelo Homem na forma de diversos produtos lácteos.

Produtos fermentados, como o queijo, foram descobertos acidentalmente, mas a sua história está também documentada ao longo de vários séculos, assim como a produção de leite concentrado, manteiga e gelados.

Só recentemente os avanços tecnológicos entraram na história dos lacticínios e, os seus processos de produção têm passado de "arte" a "ciência". No mundo moderno, a disponibilidade e distribuição do leite e dos seus derivados é fruto duma herança secular do fabrico de produtos tradicionais, aliada agora à aplicação da ciência e de novas tecnologias.

O leite é um fluido biológico complexo, composto essencialmente de água, gordura, proteínas, lactose, vitaminas e compostos inorgânicos, possuindo grande número destas substâncias um elevado valor nutricional e tecnológico. Destacam-se das suas características nutricionais, a presença em diferentes quantidades, de todos os aminoácidos essenciais, o que confere às proteínas lácteas um elevado valor biológico. Para além disso, o padrão de distribuição desses aminoácidos assemelha-se ao que se julga ser ideal para o homem. As proteínas do leite, de acordo com a sua estrutura e comportamentos físico-químicos, são tradicionalmente agrupadas em duas grandes fracções: as caseínas e as proteínas do soro.

Provavelmente, as proteínas do leite são das proteínas alimentares, as melhor caracterizadas. Contudo, a existência de polimorfismos genéticos e não genéticos, assim como a aplicação de tratamentos tecnológicos, dificulta a sua quantificação. Modificações como a desnaturação térmica e a proteólise, comum na produção de muitos produtos lácteos, originam um aumento de novos compostos, pequenos péptidos e aminoácidos, que pela sua complexidade tornam a sua análise mais difícil (Recio *et al.*, 1997).

A inexistência de métodos rápidos e exactos fizeram com que durante muito tempo a investigação das proteínas do leite assim como, o controlo da qualidade na indústria de lacticínios, fossem pouco fiáveis. Uma maior fiabilidade ocorreu com a introdução dos métodos colorimétricos nos anos 60, seguidos pelo desenvolvimento de técnicas de infravermelho, as quais tinham a vantagem de medirem directamente todos os constituintes maioritários do leite: gordura, proteínas e lactose (Grappin e Ribadeau-Dumas, 1992).

Actualmente, os métodos mais aplicados ao doseamento das proteínas, péptidos e aminoácidos do leite, que permitem a sua separação e quantificação, são os métodos electroforéticos, cromatográficos e imunológicos.

Apesar do leite ser uma bebida muito tradicional e por isso, muitas vezes vista como um produto fora de moda, tem excelentes características nutricionais, e uma relação qualidade/preço que lhe confere um papel de destaque na alimentação diária. Aliado a este facto, o crescente interesse e consumo de produtos lácteos regionais como os queijos de Denominação de Origem Protegida, entre os quais o Queijo Terrincho, torna indispensável o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas analíticas que permitam assegurar a sua autenticidade e controlar eventuais fraudes.

Deste modo, o presente trabalho pretende contribuir para o alargamento dos conhecimentos nesta área, tendo sido fixados os seguintes objectivos: i) desenvolvimento de uma metodologia por HPLC e outra por electroforese que permitam a separação das caseínas de leite de vaca, ovelha e cabra; ii) aplicação das referidas metodologias na pesquisa de adulterações de leite de vaca em leite e queijo de ovelha e em leite de cabra; iii) avaliação da proteólise das caseínas de queijos.

Assim, no capítulo 1 apresenta-se uma abordagem teórica, caracterizando a composição proteica do leite e a proteólise de queijos, bem como uma referência genérica às principais metodologias analíticas, descritas na literatura, para o controlo de qualidade destes produtos.

No capítulo 2 descrevem-se as metodologias desenvolvidas, o equipamento e reagentes utilizados, a preparação das amostras e as condições de análise.

No capítulo 3 são apresentados e discutidos os resultados obtidos por HPLC em fase reversa e por electroforese, comparando-se o desempenho de cada uma das referidas metodologias.

Finalmente, no capítulo 4 apresentam-se as conclusões e fazem-se algumas sugestões para trabalho futuro.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E COMPOSIÇÃO PROTEICA DO LEITE

1.2. O QUEIJO E PRINCÍPIOS GERAIS DA PROTEÓLISE

1.3. CONTROLO DA QUALIDADE DOS LACTICÍNIOS

1.4. OBJECTIVOS

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E COMPOSIÇÃO PROTEICA DO LEITE

O leite é um fluido biológico complexo, composto essencialmente por água, gordura, proteínas, lactose e sais minerais. Para além destes, existem ainda, em quantidades mínimas, lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos, gases dissolvidos, etc., alguns dos quais com grande importância devido à sua actividade biológica e pelo seu papel preponderante nas propriedades nutricionais, tecnológicas e sensoriais do leite e produtos lácteos. Na Figura 1.1. está resumida a composição físico-química do leite. Neste trabalho, ao referir-se "leite", deve entender-se como leite de origem bovina, excepto quando se referir outra origem.

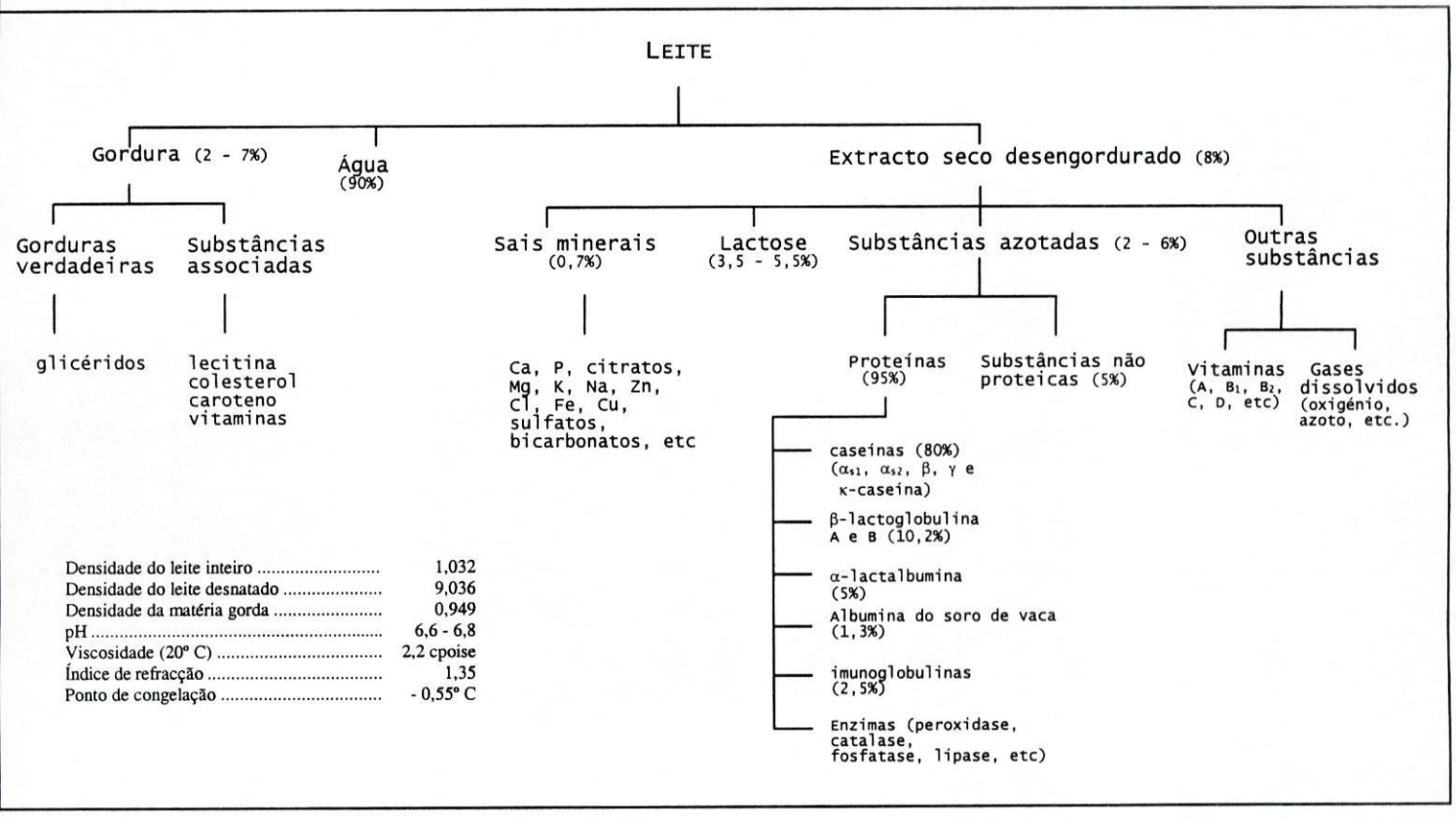


Figura 1.1. - Composição físico-química do leite (valores médios) (adaptado de Splitt *et al.*, 1996).

A composição do leite varia consoante a espécie animal, embora em quantidades diferentes, os constituintes principais são os mesmos (Tabela 1.1.). Dentro da mesma

espécie a sua composição também difere, o que se deve, principalmente, a factores fisiológicos, alimentares, climáticos, genéticos e zootécnicos.

Tabela 1.1. - Composição média (%) de leites de vários mamíferos (retirado de Alais, 1985).

ESPÉCIE	CONSTITUINTE						
	Água	Gordura	Proteína	Lactose	Cinzas	Sólidos não gordos	Sólidos totais
Mulher	87,43	3,75	1,63	6,98	0,21	8,82	12,57
Vaca	87,20	3,70	3,50	4,90	0,70	9,10	12,80
Cabra	87,00	4,25	3,52	4,27	0,86	8,75	13,00
Ovelha	80,71	7,90	5,23	4,81	0,90	11,39	19,29
Búfala	78,46	10,35	5,88	4,32	0,84	11,19	21,54
Camela	87,61	5,38	2,98	3,26	0,70	7,01	12,39
Égua	89,04	1,59	2,69	6,14	0,51	9,37	10,96
Burra	89,03	2,53	2,01	6,07	0,41	8,44	10,97
Rena	63,30	22,46	10,30	2,50	1,44	14,24	36,70

Apesar da composição ter muita importância nas propriedades do leite, é também fundamental considerar a sua estrutura e propriedades físicas. O leite é um sistema dinâmico devido fundamentalmente à instabilidade da sua estrutura. De entre vários factores que podem provocar essa instabilidade destacam-se as membranas dos glóbulos de gordura, a alteração da solubilidade de vários constituintes com a temperatura e o pH, especialmente os sais e as proteínas, a presença de várias enzimas que podem alterar os constituintes (lipólise ou proteólise), o crescimento de microrganismos que podem causar alterações directamente relacionadas com o seu crescimento ou através de enzimas que secretam.

Na natureza, o leite aparece na forma líquida, o que pode parecer curioso se se considerar o facto do leite ser composto por menos água que a maior parte dos frutos e vegetais. Do ponto de vista puramente físico, o leite pode ser considerado uma emulsão, uma dispersão coloidal e uma solução verdadeira, porque os seus constituintes estão presentes e distribuem-se por três estados.

Assim, pode-se descrever o leite como:

- *emulsão óleo/água* - com os glóbulos de gordura dispersos numa fase contínua - o soro;
- *dispersão coloidal* - das micelas de caseína, proteínas globulares e partículas de lipoproteínas;
- *solução* - de lactose, proteínas solúveis, minerais, vitaminas e outros compostos.

Observando o leite ao microscópio a uma baixa ampliação (2×), observa-se um líquido uniforme, mas opaco. A uma maior ampliação (1000×) observam-se os glóbulos de gordura, enquanto que com uma ampliação superior (10000×), já se observam as micelas de caseína. Esta estrutura está representada na Figura 1.2.

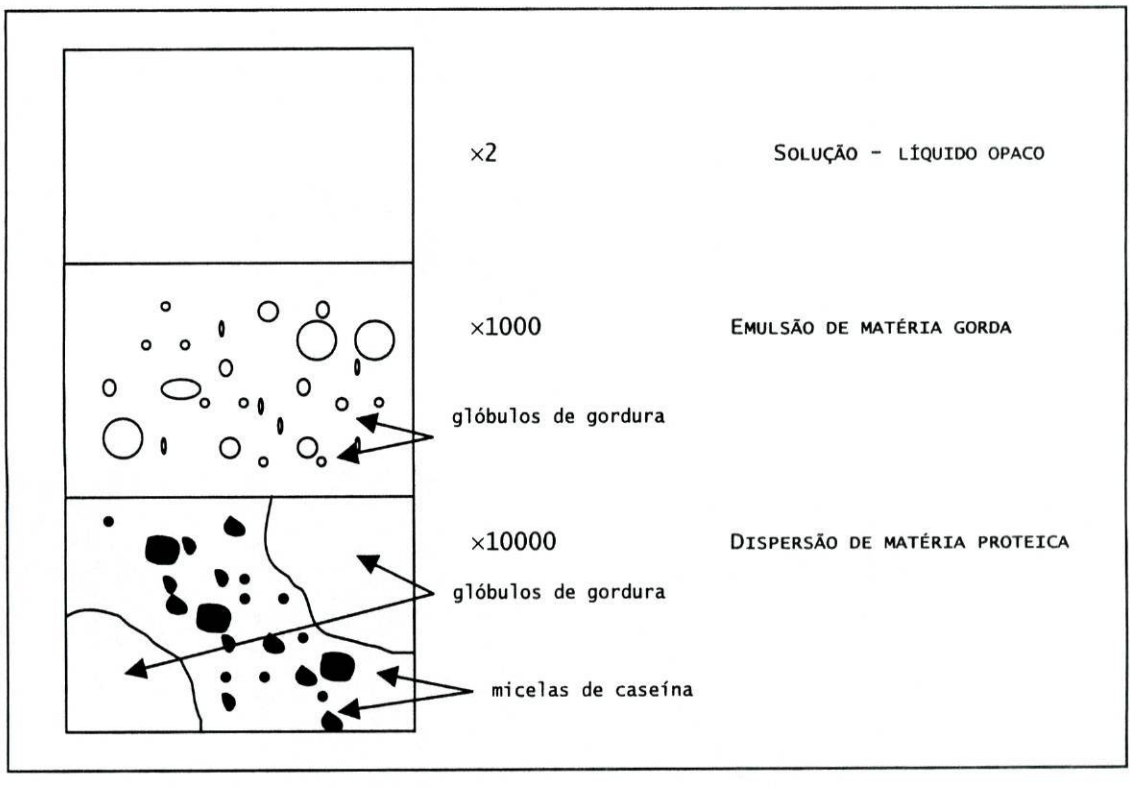


Figura 1.2. - Estrutura do leite.

O aspecto opaco e turvo do leite é devido às partículas suspensas de gordura, proteínas e certos sais minerais (Figura 1.3.). A cor depende fundamentalmente da sua constituição em gordura podendo variar de branca a amarela (Vicent, 1990). Este aspecto característico resulta principalmente da dispersão da luz devido às micelas de caseína. Os glóbulos de gordura dispersam também a luz, no entanto, contribuem pouco para a cor branca, porque a

sua dimensão é muito superior ao comprimento de onda médio da luz solar. O leite rico em matéria gorda apresenta uma ligeira coloração amarela devido à presença de caroteno. A ausência deste pigmento amarelo, no leite desnatado, faz com que este se apresente branco-azulado (Alais, 1985).

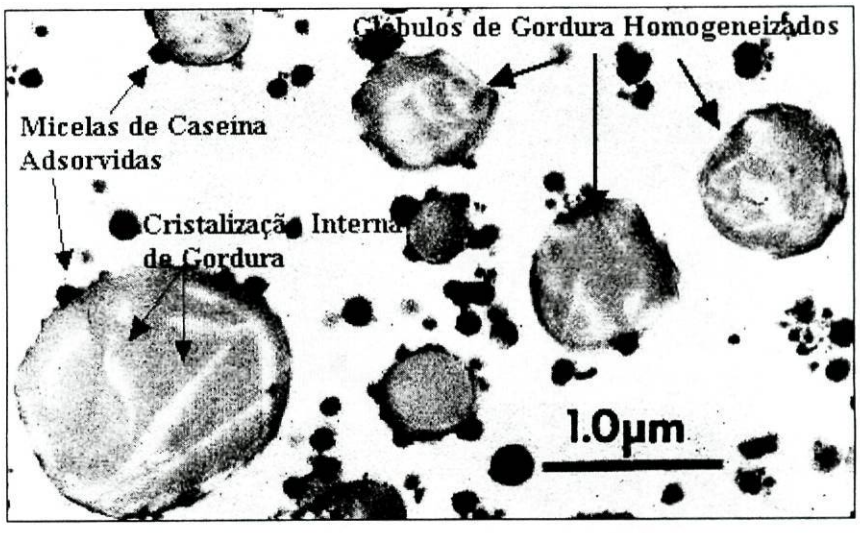


Figura 1.3. - Aspecto dos glóbulos de gordura do leite.

O papel do leite na dieta tradicional tem variado muito nas diferentes regiões do mundo. Os países tropicais não são consumidores tradicionais de leite, ao contrário do que se passa nos países do Norte da Europa, especialmente na Escandinávia, e da América do Norte. Segundo a Federação Internacional de Lacticínios (FIL), em 1996 a produção total de leite foi estimada em 527×10^6 toneladas, das quais 59% foram produzidas na Europa e América do Norte (Fox e McSweeney, 1998). A produção de leite e de produtos lácteos constitui uma das actividades agrícolas mais importantes a nível mundial, tendo-se observado, nos últimos anos, uma tendência para a estabilização do consumo destes produtos, verificando-se, no entanto, uma tendência de descida para o leite líquido e um ligeiro crescimento para o queijo e iogurtes.

O leite apresenta-se como uma matéria prima bastante atractiva, principalmente devido ao facto de ser facilmente convertido em produtos com características organolépticas e físicas desejáveis, sem que os seus constituintes percam as suas propriedades funcionais. Por outro lado, os seus constituintes principais, lípidos, proteínas e hidratos de carbono, podem ser facilmente isolados e purificados de modo a serem

utilizados como ingredientes alimentares. Para além disso, o leite é constituído por nutrientes essenciais em concentrações adequadas e numa forma de fácil digestão. Contudo, uma das limitações, deste produto como matéria prima, é a sua fácil degradação, uma vez que, é uma excelente fonte de nutrientes para os microrganismos. Assim, até à moderna era industrial existiam poucos produtos lácteos, que consistiam essencialmente no leite inteiro e desnatado, a nata, a manteiga e os queijos. Actualmente a lista de produtos lácteos e derivados é cada vez maior: leite de consumo não modificado, apenas sujeito a tratamentos térmicos ou desnatado parcialmente, leites concentrados, em pó, fermentados ou acidificados como o iogurte e kefir, nata, manteiga, azeite de manteiga e diversos tipos de manteiga fundida desidratada, queijo, produtos obtidos do soro como a lactose e ácido láctico, requeijão, concentrado proteico, produtos vitamínicos. Existem ainda outros produtos alimentares que contêm componentes lácteos, como produtos de pastelaria e sobremesas lácteas, entre outros. Estes produtos estão a dar origem a uma nova geração de alimentos lácteos que se pretende com uma imagem diferente, outras funções e novas possibilidades nutricionais. A geração de consumidores que se considera ser o futuro mercado destes produtos, essencialmente crianças e idosos, necessita de alimentos que estimulem o apetite através da melhoria e realce do sabor e aroma, que tenham uma textura adequada para uma dentição deficiente e dificuldade de assimilação, sejam ricos em nutrientes, quer macro, quer micronutrientes e ajudem a promover boas condições de saúde. A modificação dos tradicionais produtos alimentares deve incluir, por isso, alterações ou redução da gordura, colesterol, sódio ou calorias e a adição de componentes benéficos como o cálcio, assim como, compostos já presentes naturalmente nos alimentos lácteos (Duncan, 1998).

O leite é sujeito a vários processos tecnológicos com vista à sua estabilização e preservação, não só na forma líquida, mas também em todos os produtos lácteos já referidos anteriormente. A pasteurização e outros tratamentos térmicos mais rigorosos, como a esterilização, são necessários para o controlo microbiológico, tendo em vista a manutenção da saúde pública. Outros processos, como a homogeneização, concentração, re-hidratação, refrigeração, coagulação e agitação são utilizados para modificar a composição e as propriedades do leite e para possibilitar a produção de outros produtos lácteos, também eles de grande interesse para o consumidor. Contudo, o efeito desses

processos no leite é ainda pouco compreendido (Brunner, 1976; Alais, 1985; Cayot e Lorient, 1997).

1.1.1. Proteínas Lácteas

As substâncias nitrogenadas formam a parte mais complexa do leite e é sem dúvida sobre esta fracção que a investigação se tem debruçado mais intensamente. A matéria azotada do leite é dividida em: proteica, que corresponde a 95% do azoto total, e não proteica (ureia, ácido úrico, creatinina, creatina, ácido hipúrico, ácido orótico, indican, fosfotidiletanolamina, fenilacetilglutamina, etc.), que corresponde aos restantes 5% (Guillou *et al.*, 1986). A composição típica da fracção da matéria azotada não proteica é apresentada na Tabela 1.2. Estes compostos apesar de se encontrarem no leite em baixas concentrações influenciam as suas propriedades, por exemplo a sua estabilidade térmica está fortemente relacionada com a concentração de ureia (Fox, 1989a; Singh e Creamer, 1992).

Tabela 1.2. - Principais compostos da matéria azotada não proteica do leite (retirado de Fox, 1989a).

CONSTITUINTES	CONCENTRAÇÃO (mg N/kg leite)
Ureia	84-280
Creatina	6-25
Creatinina	2-12
Ácido úrico	5-8
Ácido orótico	12-15
Ácido hipúrico	4
Péptidos	32
Amónia	3-14
Aminoácidos	29-51

A importância da parte proteica do leite deve-se a vários factores:

- é uma das fracções constituintes do leite que se encontra em maior concentração;
- as propriedades físico-químicas mais importantes do leite, especialmente a sua estabilidade, derivam da presença das proteínas na forma micelar;

- do ponto de vista nutritivo, as proteínas constituem uma parte importante do leite;
- as proteínas são os componentes fundamentais das células nos organismos vivos. Algumas proteínas do soro têm actividades biológicas - enzimas, inibidores, anticorpos (Alais, 1985).

As propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas dependem da sua composição ou seja das propriedades químicas dos seus resíduos de aminoácidos (Alais, 1985; Kinsella *et al.*, 1989). Na Tabela 1.3. é apresentada a natureza molecular das principais proteínas do leite.

Tabela 1.3. - Classificação molecular das proteínas do leite (adaptado de Brunner, 1981).

Grupos	Moléculas	Proteínas do leite desnatado (%)	Peso Molecular (daltons) (valores aproximados)	Aminoácidos	Grupos por mole		
					P	Ligação -S-S- Cistina	Grupos -SH Cisteína
Caseínas	α_{s1}	39-46	23600	199	8	---	---
	α_{s2}	8-11	25150	207	10 a 13	---	2
	β	25-35	24000	209	5	---	---
	κ	8-15	19000	169	1	---	2
	γ	3-7			1	---	---
	γ^1		20500				
	γ^2		11800				
	γ^3		11500				---
75% a 85% das proteínas							
Proteínas do soro	β-lactoglobulina	7-12	18300	162	---	2	1
	α-lactalbumina	2-5	14200	123	---	4	---
	BSA	0,7-1,3	66300	582	---	17	1
	Imunoglobulinas	1,9-3,3				Presente e variável	
	Ig G_1	1,2-3,3	162000				
	Ig G_2	0,2-0,7	152000				
	Ig A	0,2-0,7	400000				
	Ig M	0,1-0,7	950000				
	FSC (s)	0,2-0,3	80000				
	Proteose-peptona	2-4	4000-40000		0,5-2,0	---	---
15% a 22% das proteínas							

FSC - Free Secretory Component

Todas as proteínas do leite apresentam polimorfismo genético o que influencia a sua composição e processamento. As principais proteínas lácteas apresentam várias formas genéticas, que são designadas normalmente pelas letras A, B, C. Na espécie bovina a frequência dos tipos genéticos depende da raça (Alais, 1985).

As variantes genéticas de uma proteína distinguem-se apenas por pequenas diferenças na sua composição, devido a mutações resultantes de uma substituição de aminoácidos na cadeia peptídica. Por exemplo, se a substituição ocorre em aminoácidos de cargas

diferentes, um aminoácido dicarboxílico que substitui um aminoácido neutro, verifica-se pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas. Como a carga total da molécula não é a mesma, poder-se-á por isso, identificar as variantes genéticas por electroforese, focagem isoeléctrica, cromatografia líquida de alta pressão ou por electroforese capilar (Alais, 1985; Strange *et al.*, 1992; Visser *et al.*, 1995).

O estudo destas variações tem um grande interesse quer do ponto de vista genético, quer de selecção dos animais e, mais recentemente adquiriu também um significado tecnológico (Alais, 1985). A existência de formas geneticamente determinadas, com propriedades diferentes e em proporções variáveis no leite, é talvez a principal causa das diferenças que se observam no decorrer dos tratamentos industriais do leite, por exemplo, a diferença de estabilidade durante o aquecimento e a capacidade de coagulação com o coalho (Ng-Kwai-Hang e Grosclaud, 1992).

O polimorfismo não genético devido a modificações pós-tradução, como a fosforilação, glicosilação e proteólise limitada, tem sido também relacionado com características de produção, composição e propriedades tecnológicas do leite (Kester e Richardson, 1984; Nakai e Li-Chan, 1989; Recio *et al.*, 1997). Várias propriedades das proteínas têm vindo a ser exploradas em tecnologia alimentar, nomeadamente, propriedades organolépticas, sinergéticas, estruturais, reológicas, enzimáticas e antioxidantes (Mulvihill, 1992). As caseínas, o principal grupo de proteínas do leite, podem ser facilmente purificadas através da precipitação no seu ponto isoeléctrico ou por coagulação pela renina. Por este facto foram desde muito cedo utilizadas com propósitos industriais, como na produção de colas ou de fibras sintéticas. No entanto, só desde a década de 60, foram consideradas proteínas alimentares importantes. Proporcionam textura e corpo aos alimentos, funcionam como emulsionantes e retêm a água. São frequentemente utilizadas em alimentos como produtos de pastelaria (bolos, pão, biscoitos), bebidas (lácteas e não lácteas), sopas, vegetais, carnes, sobremesas (mousses e gelados), iogurtes, cremes de café, etc. Por outro lado, as caseínas e derivados têm sido também aplicadas em diversos produtos farmacêuticos, como suplemento alimentar em preparações dietéticas, formulações para desportistas, dietas hipoalergénicas, leites de alimentação infantil, formulações para crianças, medicamentos para tratamento de artroses e úlceras gástricas, etc. (Southward, 1989; Mulvihill, 1992).

Apesar do interesse pelas proteínas do soro do leite ser mais recente, o desenvolvimento, nos anos 70, de processos de ultrafiltração, facilitou a sua purificação, tendo-se observado uma crescente aplicação destas proteínas na indústria alimentar. Devido às suas propriedades emulsificantes, gelificantes, à viscosidade e solubilidade, a sua utilização tem interesse em bebidas, produtos lácteos, cárneos, pastelaria, sopas, molhos, condimentos e produtos dietéticos (Wit, 1989; Mulvihill, 1992; Smithers *et al.*, 1996).

Estudos recentes permitiram isolar péptidos com diferentes actividades biológicas, provenientes de hidrolisados de caseína e de proteínas do soro. Estes péptidos poderão encontrar aplicação como suplemento alimentar ou mesmo em preparações farmacêuticas. Durante a última década tem-se conseguido bastante informação com respeito às propriedades bioquímicas e fisiológicas destes péptidos, nomeadamente, as suas sequências, localização e actividade. Os péptidos bioactivos, derivados das proteínas do leite, apresentam actividade opiácia, anti-hipertensiva, anti-trombótica e propriedades antibacterianas. Estão associados a mecanismos de bioconversão de iões metálicos, como cálcio, transporte de minerais e aminoácidos no estômago (Fiat *et al.*, 1993; Meisel e Schlimme, 1996; Clare e Swaisgood, 2000). Observou-se, por exemplo, que o caseinofosfopéptido inibe a cárie dentária, parecendo interessante, por isso, a sua aplicação em pasta dentífrica, material utilizado no tratamento dentário, produtos dietéticos e mesmo pastilhas elásticas (Schlimme e Meisel, 1995; Meisel e Schlimme, 1996). Estes péptidos podem ser obtidos, por exemplo, através da modificação enzimática das proteínas do soro do queijo. O soro do queijo é um subproduto do seu fabrico. Devido ao elevado número de litros de soro produzidos e à elevada carga poluente de que se reveste este efluente, é muito importante arranjar processos alternativos para a sua utilização, de maneira a valorizar as suas propriedades funcionais e nutricionais e minimizar a carga poluente. No futuro, estes péptidos poderão ser considerados como aditivos alimentares e talvez como compostos de partida para o desenvolvimento de alguns medicamentos, como por exemplo péptidos imunoestimulantes. As proteínas do leite adquirem, assim, um papel importante e uma ligação interessante entre a indústria alimentar e farmacêutica.

O leite contém vários tipos de proteínas, muitos dos quais estão presentes em pequenas quantidades, sendo normalmente classificados segundo a sua abundância, propriedades físico-químicas ou funções biológicas (Vicent, 1990).

Em função da sua solubilidade a pH 4,6 a 20 °C, as proteínas do leite podem ser separadas em duas fracções: as caseínas (insolúveis a esse pH) e as proteínas do soro (solúveis a pH 4,6) (Guillou *et al.*, 1986). As caseínas (α_{s1}, α_{s2}, β, γ e κ-caseínas) constituem, aproximadamente, 80% das proteínas lácteas. Após remoção das caseínas, obtém-se a fracção do soro que contém os restantes 20% das proteínas do leite. Para além de quantidades vestigiais de outras proteínas, as principais proteínas do soro são a albumina do soro de vaca (BSA), algumas imunoglobulinas, a α-lactalbumina (α-la) e as duas variantes genéticas da β-lactoglobulina (β-lg) (Splitt *et al.*, 1996). Algumas das proteínas minoritárias têm propriedades antimicrobianas, nomeadamente a lactotransferrina, a lactoperoxidase e a lisozima (Alais, 1985; Fox, 1989a; Morr, 1989; Hambraeus, 1992). As proteínas do soro são sensíveis ao calor, formando associações complexas quando o leite é aquecido. Estas proteínas contêm quantidades significativas de grupos sulfídrilo e ligações dissulfureto, que lhes conferem sensibilidade à desnaturação e a interacções intermoleculares durante o aquecimento do leite e dos produtos do soro. Durante o aquecimento sofrem desnaturação, havendo um desenrolamento das suas cadeias polipeptídicas e activação dos grupos sulfidrilo, interagindo, consequentemente com as micelas de caseína (Morr, 1985).

No leite encontram-se tanto enzimas exógenas como endógenas. As primeiras são normalmente termoestáveis, sendo produzidas por bactérias psicotróficas (lipases, proteases). Por outro lado, as enzimas endógenas existem em numerosas células que migram através do tecido mamário e outras são mesmo secretadas por esse tecido. As mais importantes são as hidrolases. A distribuição das enzimas no leite não é homogénea, encontram-se, quer na fase aquosa, sob a forma solúvel ou ligadas a outras proteínas, quer na fase lipídica, em especial ao nível da membrana dos glóbulos de gordura. A catalase, lactoperoxidase, ribonuclease, entre outras, são encontradas principalmente no soro do leite, outras como as proteases e lipases, estão associadas às micelas de caseína, ou às membranas dos glóbulos de gordura, como xantina oxidase e fosfatase (Alais, 1985; Andrews, 1992). A plasmina é a principal protease endógena do leite de boa qualidade. Esta enzima actua sobre as proteínas, quebrando as ligações peptídicas nos grupos carboxílicos da arginina e lisina. A sua actividade proteolítica está ligada à caseína, sobretudo à β e α_{s2}-caseínas. É uma enzima muito estável ao calor, no entanto, a sua estabilidade depende

do pH. É também responsável pelo desenvolvimento de péptidos amargos em leites pasteurizados e *Ultra-High-Temperature* (UHT). Tem um papel importante na maturação e *flavour* de certos queijos, como o queijo tipo suíço (Andrews, 1983; Alais, 1985; McSweeney *et al.*, 1994; Trujillo *et al.*, 1997). Alguns tratamentos tecnológicos como a homogeneização, aquecimento e a desnatação, podem também provocar uma redistribuição das enzimas nas diferentes fases do leite (Andrews, 1992).

As proteínas dos glóbulos de gordura caracterizam-se por formar uma espécie de membrana protectora em volta destes. As suas propriedades são semelhantes às da membrana celular, mas têm uma consistência que pode variar desde suave e gelatinosa em algumas proteínas, até bastante firme e forte noutras (Vicent, 1990). Estudos electroforéticos em géis de poliacrilamida contendo fortes agentes dissociantes como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e β-mercaptoetanol, revelaram que estas proteínas são essencialmente lipoglicoproteínas (Brunner, 1976). Os lípidos e os aminoácidos hidrofóbicos destas proteínas fazem com que estas moléculas dirijam os seus pontos hidrofóbicos para a superfície da gordura, enquanto que as zonas menos hidrofóbicas se orientam para a água (Vicent, 1990).

As caseínas são as proteínas mais estudadas no conjunto das proteínas alimentares. De facto, para cada caseína isolada conhece-se a sua estrutura primária (Swaisgood, 1992).

As caseínas correspondem a cerca de 2,5 a 3,2% do leite e a cerca de 80% do total das proteínas do leite. Não se lhes conhece outra função biológica para além de fornecer azoto, cálcio e aminoácidos essenciais (Grosclaud *et al.*, 1972, citados por Guillou *et al.*, 1986). Encontram-se essencialmente como micelas, as quais constituem grandes complexos esféricos que contêm aproximadamente 92% de proteínas e 8% de sais inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio (Schmidt, 1980; Swaisgood, 1985; Whitney, 1988, citados por Swaisgood, 1992).

As caseínas foram consideradas como proteínas homogéneas, mas na verdade são uma mistura de proteínas que podem ser separadas por electroforese. São conhecidos quatro tipos principais de caseínas, α_{s1}, α_{s2}, β e κ-caseínas, que são sintetizados na glândula mamária a partir de quatro genes diferentes, situados no mesmo cromossoma (Grosclaude *et al.*, 1972, citados por Guillou *et al.*, 1986). Outras caseínas identificadas em perfis cromatográficos ou electroforéticos, são consideradas como derivadas de transformações pós-tradução desses quatro tipos principais (Swaisgood, 1992). Estas proteínas minoritárias

provêm essencialmente da acção de uma proteinase alcalina, a plasmina, enzima proveniente do sangue e naturalmente presente no leite. Os polipéptidos resultantes incluem, a γ-caseína e a proteose-peptona, resultantes da β-caseína, a λ-caseína que deriva da α_{s1}-caseína e, pelo menos mais 30 péptidos ainda não identificados, a maior parte dos quais, derivados, provavelmente, das principais caseínas e classicamente incluídos na fracção de proteose-peptona (Fox, 1989a).

A α_{s1}, α_{s2} e β-caseínas são fosfoproteínas, enquanto que a κ-caseína é uma fosfoglicoproteína (Ribadeau-Dumas, 1979, citado por Guillou *et al.*, 1986). Exibem um estado anfifílico devido à separação dos resíduos ácidos, fosfoésteres, hidrofóbicos e hidrofílicos ao longo das suas cadeias polipeptídicas (Morr, 1985). São proteínas fortemente hidrofóbicas ($\beta>\kappa>\alpha_{s1}>\alpha_{s2}$), embora, os resíduos hidrofóbicos não se encontrem uniformemente distribuídos. Por outro lado, os resíduos fosfoseril encontram-se particularmente próximos, o que tem uma influência marcante nas propriedades de ligação das caseínas a metais, tendo consequências tecnológicas e nutricionais importantes, reduzindo a biodisponibilidade de ferro e zinco (Fox, 1989a).

A abundância e distribuição uniforme de resíduos de prolina faz com que as caseínas sejam moléculas relativamente pequenas (20 000-24 000 daltons), anfifílicas, pouco estruturadas, enroladas e abertas, o que influencia consideravelmente as suas propriedades funcionais (Brunner, 1981; Morr, 1985; Fox, 1989a). Os resíduos de prolina interrompem a estrutura em α-hélice e camada β, mas permitem um tipo de estrutura estável (Fox, 1989a; Swaisgood, 1993), que lhes confere uma estabilidade à desnaturação térmica. Por outro lado, confere-lhes uma forte tendência de polimerização por interacções hidrofóbicas, ligações iónicas e cálcio, que se traduz numa insolubilização a pH 4,6, a temperaturas superiores a 20 °C (Morr, 1985; Swaisgood, 1993). Algumas propriedades das caseínas encontram-se resumidas nas Tabelas 1.3. e 1.4.

Com a descoberta de que a composição do leite e as propriedades funcionais das suas proteínas variam consoante a variante genética, a sua identificação tem adquirido maior importância. Estudos recentes têm demonstrado que o polimorfismo genético tem interesse tecnológico, especialmente em relação à produção do queijo (Fox, 1989a). São conhecidas cinco variantes genéticas da α_{s1}-caseína (A, B, C, D e E), quatro da α_{s2}-caseína (A, B, C e

D), sete da β-caseína (A^1, A^2, A^3, B, C, D, E) e duas da κ-caseína (A, B) (Eigel *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1996) .

Tabela 1.4. - Propriedades físico-químicas das caseínas (adaptado de Morr, 1985).

- constituem aproximadamente 80% do teor proteico total do leite
- peso molecular entre 19 000 e 25 000
- conformação pouco estruturada
- propriedades anfifílicas
- interacções hidrofóbicas e ligações cálcio
- insolúveis no seu ponto isoeléctrico (pH 4 a 5) a temperatura superior a 20 °C
- micelas de caseínas associadas através de fosfato coloidal
- as micelas de caseína têm um diâmetro entre 100 a 300 nm
- as micelas de caseína coagulam pela acção da renina
- as micelas de caseína são estabilizadas pela κ-caseína
- as micelas de caseína interactuam com a β-lactoglobulina por ligações dissulfureto

A α_{s1}-caseína é constituída por 199 aminoácidos e 8 grupos fosfato. Apresenta um peso molecular de 23 600 e possui três regiões muito hidrofóbicas que incluem os resíduos 1-44, 99-113 e 132-199. É facilmente precipitada quando uma grande quantidade de iões Ca^{2+} se ligam a ela, pois essas ligações causam alterações conformacionais, induzindo a exposição de maior número de grupos hidrofóbicos ao solvente. Entre os aminoácidos 41-80 encontra-se a maior parte dos grupos fosfato que ligam o cálcio e que conferem a esta zona uma carga bastante negativa (Eigel *et al.*, 1984; Swaisgood, 1992).

A α_{s2}-caseína contém mais 8 aminoácidos que a α_{s1}-caseína, possuindo 2 cisteínas. O seu peso molecular é aproximadamente 25 150. Possui 11 resíduos fosfoseril, sendo a mais hidrofílica de todas as caseínas, com uma hidrofobicidade idêntica à maioria das proteínas globulares. Existem três zonas na proteína com resíduos fosfoseril entre os aminoácidos 8-16, 56-63 e 129-133. As regiões hidrofóbicas são a região C-terminal 160-207 e a região central 90-120. Consequentemente a sua estrutura e propriedades físicas são extremamente sensíveis à presença de catiões como protões e cálcio (Eigel *et al.*, 1984; Swaisgood, 1992; McSweeney *et al.*, 1994).

A β–caseína é constituída por 209 aminoácidos e tem cerca de 24 000 daltons. Esta caseína precipita também na presença de cálcio, no entanto, este fenómeno é fortemente dependente da temperatura. A β-caseína, a 4 °C e no ambiente iónico característico do leite, é solúvel, o que não acontece com as α-caseínas, que precipitam na presença de cálcio. Com o aumento da temperatura esta caseína vai-se tornando menos solúvel e associa-se às outras caseínas. É a mais hidrofóbica de todas as caseínas possuindo duas zonas claramente separadas, uma muito carregada e outra altamente hidrofóbica. A zona N-terminal da proteína, correspondente a um décimo do tamanho da molécula, possui um terço do total das cargas, enquanto que, a zona C-terminal, correspondente a dois terços da molécula, é muito hidrofóbica possuindo uma elevada frequência de resíduos de prolina (Eigel *et al.*, 1984; Swaisgood, 1992).

As γ-caseínas são um grupo heterogéneo de proteínas que constituem cerca de 5% do total das caseínas do leite e resultam, como já foi referido, da proteólise da β–caseína. Na Figura 1.4. está representada a relação entre as γ e β–caseínas. O comité de nomenclatura da *American Dairy Science Association* recomenda a seguinte nomenclatura para as γ-caseínas: γ^1 (segmento da β–caseína 29-209, 20 500 daltons); γ^2 (segmento da β–caseína 106-209, 11 800 daltons); γ^3 (segmento da β–caseína 108-206, 11 500 daltons). Como as γ-caseínas são derivadas da fracção C-terminal da β–caseína, são extremamente hidrofóbicas. Da fracção N-terminal resulta a proteose-peptona, PP-8 rápido, PP-8 lento e PP-5 (Brunner, 1981).

A κ-caseína é constituída por 169 aminoácidos e tem um peso molecular de 19 000. Caracteriza-se pela ausência de zonas com fosfoserinas tendo apenas um resíduo Ser 149 e a ligação dos hidratos de carbono aos resíduos de treonina. Consequentemente, esta proteína é solúvel na presença de iões Ca^{2+}. Vários estudos têm permitido observar que a κ-caseína interactua com as α e β–caseínas estabilizando-as na presença do ião cálcio (Eigel *et al.*, 1984; Swaisgood, 1992). Esta caseína é uma molécula anfifílica com a região N-terminal entre os aminoácidos 1-105, designada por *para*-κ-caseína, caracterizada por uma elevada concentração de resíduos hidrofóbicos e dois resíduos de cisteína. Por outro lado, a fracção C-terminal entre os aminoácidos 106-169, designada por glicomacropéptido, é bastante polar. Contém todas as modificações pós-tradução, sobretudo glicosilação, e todas as

variações genéticas (Brunner, 1981). O glicomacropéptido é a região mais hidrofílica da caseína total, estando carregado negativamente e à superfície das micelas, conferindo-lhes em solução estabilização estérica e electrostática (Eigel *et al.*, 1984; Swaisgood, 1992).

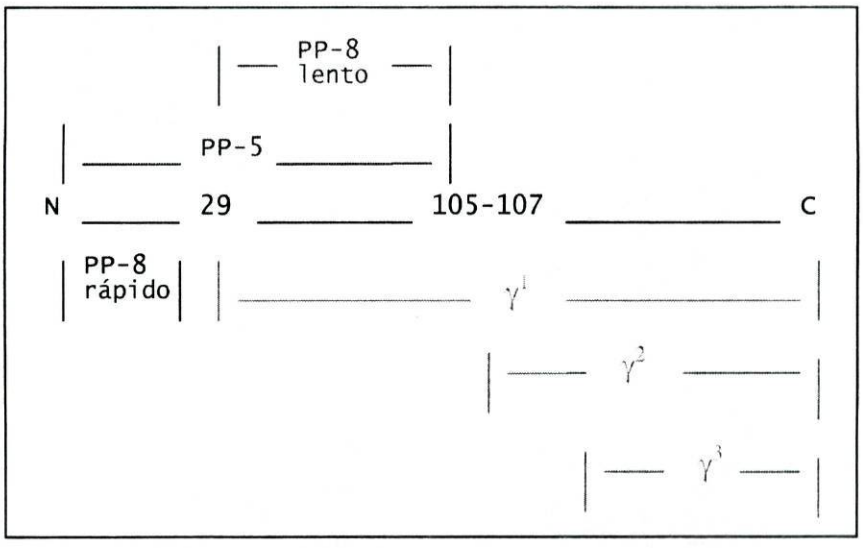


Figura 1.4. - Produção das γ-caseínas e proteose-peptona por proteólise da β-caseína (adaptado de Fox e McSweeney, 1998).

A estrutura da κ-caseína confere-lhe uma susceptibilidade inferior às outras caseínas para proteólise geral. Contudo, a existência de uma ligação peptídica muito sensível, a Phe^{105}-Met^{106}, cuja sequência próxima dos aminoácidos 98-111, pode promover a proteólise. Esta zona encontra-se muito exposta às proteases coagulantes do leite quer pela presença de histidinas e de prolinas, quer pela sua estrutura secundária que possui três β–inversões da direcção da cadeia. A quebra dessa ligação peptídica pela renina separa a *para*-κ-caseína, que permanece ligada às micelas de caseína e o glicomacropéptido que se encontra solúvel no soro do leite (Léonil e Mollé, 1991; Swaisgood, 1992).

As caseínas são únicas pelas suas propriedades físicas, não se assemelhando nem às proteínas globulares típicas nem às proteínas fibrosas. Com efeito, as caseínas associam-se, formando partículas de 100 nm em dispersão coloidal, as micelas de caseína. Estas micelas são largos complexos esféricos formados pelas várias caseínas e substâncias inorgânicas. Em base seca, são constituídas por cerca de 94% de proteínas e 6% de pequenos iões,

principalmente cálcio, fosfato, magnésio e citrato, designados colectivamente como fosfato de cálcio coloidal (Fox, 1989a).

O arranjo único das caseínas e do fosfato de cálcio em micelas é uma consequência das suas propriedades peculiares. Estas reflectem-se no seu comportamento de auto-associação. Nas últimas décadas, as propriedades das caseínas e das micelas de caseínas têm sido revistas por vários autores (Payens e Vreeman, 1982; Schmidt, 1982; McMahon e Brown, 1984; Ruettiman e Ladish, 1987; Farrell, 1988; Whitney, 1988, citados por Rollema, 1992).

As caseínas têm tendência a associar-se devido à sua elevada hidrofobicidade e distribuição de carga particular. As principais ligações envolvidas são interacções hidrofóbicas, pontes de hidrogénio e dissulfureto, ligações electrostáticas e pontes de cálcio na presença deste ião. Um delicado balanço entre estas ligações depende de condições experimentais, como o pH, a temperatura e a força iónica, e determina o tipo e extensão da associação (Rollema, 1992). Assim, este grupo de proteínas não só têm tendência à auto-associação, como interagem fortemente entre si, associando-se devido a estas ligações que contribuem para a sua integridade e estabilidade.

Apesar de pormenores da estrutura das micelas de caseína continuarem ainda desconhecidos, métodos como a microscopia electrónica, a electroforese, a viscosimetria, a ultracentrifugação e a turbidimetria foram usados no seu estudo e contribuíram para a apresentação de vários modelos da sua estrutura: modelo de núcleo-invólucro, modelo de estrutura interna e modelo de submicelas.

O modelo de submicelas, que é extensamente mas não universalmente aceite, propõe que as micelas são compostas por submicelas esféricas com diâmetro de 10-15 nm, que se mantêm ligadas em resultado das suas interacções superficiais e apresentam uma estrutura porosa. É este modelo que, até ao momento, consegue conciliar mais adequadamente todos os dados experimentais existentes (Rollema, 1992).

Vários autores, Morr (1967, citado por Rollema, 1992), Slattery e Evard (1973, citado por Rollema, 1992), Schmidt (1982, citado por Rollema, 1992) e Walstra (1990, citado por Rollema, 1992), contribuíram para o conceito actual do modelo de submicelas. É proposto neste modelo, que a κ-caseína se encontra à superfície das submicelas, mesmo sabendo-se que nem todas as submicelas possuem κ-caseína. À superfície da micela ficam sobretudo as submicelas mais ricas em κ-caseína. Por outro lado, as submicelas encontram-se ligadas por pontes de

$Ca_9(PO_4)_6$ que se estabelecem entre os grupos fosfato da α_{s1}, α_{s2} e β-caseínas. As submicelas assemelham-se a esferas, dando também à micela uma forma esférica imperfeita, como se pode observar na Figura 1.5. (Brunner, 1981; Rollema, 1992; Ginger e Grigor, 1999).

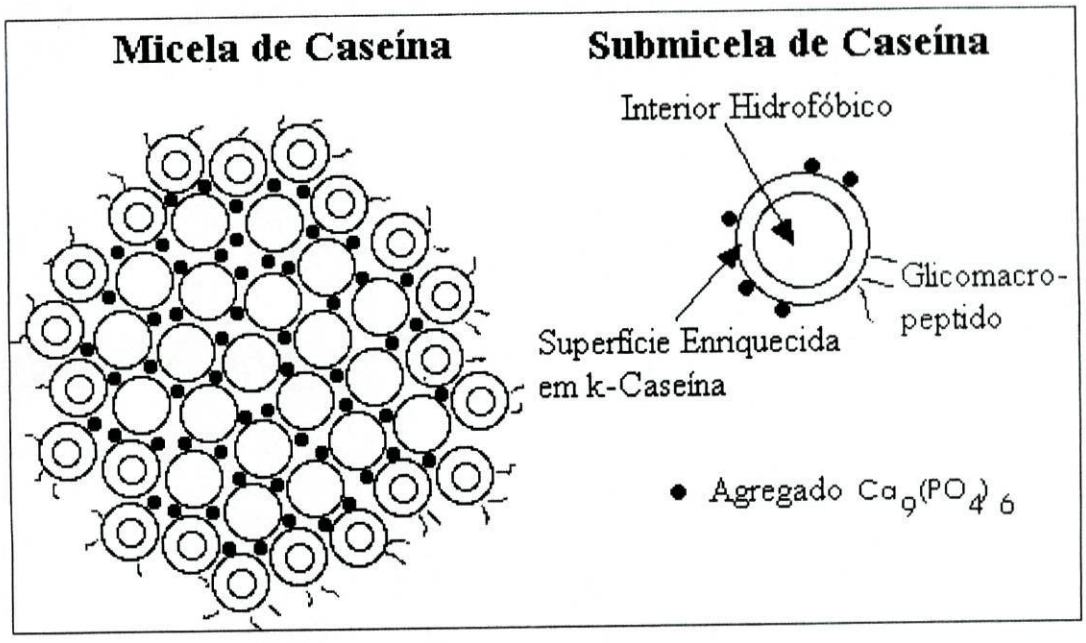


Figura 1.5. - Modelo de submicelas proposto por Walstra (adaptado de Rollema, 1992).

A κ-caseína tem um papel estabilizador das micelas, pois contém o glicomacropéptido carregado negativamente que se encontra à superfície das micelas formando "cabelos". Este péptido encontra-se ligado a resíduos de treonina estabilizando a micela na presença de iões cálcio do leite (Morr, 1985; Creamer *et al.*, 1998).

O teor proteico do leite está relacionado com as necessidades nutricionais e fisiológicas de cada espécie animal, podendo variar de 1 a 24%. Em consequência, a proporção das diferentes caseínas nos leites de vaca, cabra e ovelha difere, sabendo-se que a proporção de α_{s1} e α_{s2}-caseínas é maior no leite de ovelha (40%) do que no leite de cabra (30%) mas inferior à existente no leite de vaca (50%). A β-caseína representa cerca de 50% do total de caseína ovina e caprina, enquanto que para a bovina corresponde a cerca de 40%. Quanto à κ-caseína, o teor é semelhante nos leite de vaca e de ovelha (10%) sendo de 20% para o leite de cabra (Haza et al., 1996). No entanto, para o leite de ovelha, estão

descritos na literatura valores entre 30 a 47% para a α-caseína, 36 a 47% para a β-caseína e 10 a 17% para a κ-caseína. Para o leite de cabra entre 8 a 50% para a α-caseína, 43 a 75% para a β-caseína e 15 a 29% para a κ-caseína (Haza *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996; Kalantzopoulos, 1999). Para o leite de vaca entre 45 a 55% para a α-caseína, 25 a 35% para a β-caseína e 8 a 15% para a κ-caseína (Wong et al., 1996).

O leite de cabra apresenta baixos teores de α-caseína, contendo normalmente uma maior quantidade de α_{s2} do que de α_{s1}-caseína. Esta última encontra-se presente em proporções muito variáveis consoante a raça, tal como constatado por Boulanger *et al.* (1984, citado por Kalantzopoulos, 1999).

As caseínas ovinas apresentam um peso molecular de 19 213, 25 622, 23 401 e 23 751 para a κ, α_{s2}, α_{s1} e β–caseína, respectivamente (Trujillo *et al.*, 2000a). Enquanto que, os pesos moleculares das caseínas caprinas são de 19 306, 25 679, 23 347 e 23 781, respectivamente, para a κ, α_{s2}, α_{s1} e β–caseína. Estes valores foram calculados atendendo à sua composição em aminoácidos (Trujillo *et al.*, 2000b).

As micelas de caseína ovina são semelhantes às de caseína bovina. Ambas contêm fracções sensíveis à acção da renina. Ensaios de microscopia electrónica permitiram verificar, no entanto, que as micelas de caseína ovina são mais pequenas que as bovinas, apresentando a maioria delas um diâmetro inferior a 80 nm (Kalantzopoulos, 1999). As micelas de caseína de leite de cabra parecem ser bastante diferentes das de leite de vaca e ovelha, apresentando, contudo, diâmetros da mesma ordem de grandeza das ovinas. Essas diferenças são atribuídas à reduzida abundância da α_{s1}-caseína (Jenness, 1980; Raynal e Remeuf, 2000).

1.2. O QUEIJO E PRINCÍPIOS GERAIS DA PROTEÓLISE

A maioria dos investigadores consideram que o queijo foi inicialmente produzido no Médio Oriente. Segundo a lenda, o queijo foi "descoberto", acidentalmente, por um árabe nómada. Diz-se que, para se alimentar durante uma travessia do deserto, encheu os alforges da sua montada com leite. Após várias horas de caminhada, verificou que o leite se tinha

separado originando um líquido pálido e uma massa branca sólida e uniforme. Este fenómeno ocorreu uma vez que o alforge era feito com o estômago de animal jovem, que continha uma enzima coagulante (a renina), associado ao calor e ao movimento do cavalo. Se bem que se ignorem muitos pormenores sobre as origens exactas deste alimento a história confirma a sua antiguidade, sendo já conhecido pelo antigos Sumérios há 4000 a.c.

O fabrico de queijo encontra-se localizado essencialmente na Europa, América do Norte e do Sul, Austrália e Nova Zelândia, sendo em menor dimensão no Norte de África e no Médio Oriente. A produção e o consumo deste produto, que varia muito consoante o país e a região, tem aumentado nos países produtores tradicionais (2 a 4% por ano), e ganho uma nova dimensão em novos mercados. Numa escala global, 30% de todo o leite é usado no fabrico de queijo, sendo aproximadamente de 40% na América do Norte e de 50% na União Europeia (Fox e McSweeney, 1998).

Os queijos tradicionais possuem um conteúdo relativamente elevado de gordura, são uma fonte rica em proteínas e na maior parte dos casos de cálcio e fósforo. Relativamente ao sabor pode ser suave, amanteigado, inócuo, rico, cremoso, salgado ou levemente delicado. Quanto à textura pode ser suficientemente duro para ser cortado em fatias, ou de tal modo macio e cremoso que tem de ser ingerido com colher. O seu aroma pode ser forte, delicado ou praticamente inexistente.

O fabrico de queijo é, na sua essência, um processo de conservar os componentes do leite, um produto alimentar facilmente perecível, por períodos mais ou menos longos, e de forma mais ou menos alterada face às características iniciais, processo que encerra o contributo de várias vertentes como, por exemplo, a desidratação, a acidificação e diminuição do pH, as quais dependem das condições de fabrico. Este processo inclui uma sequência de operações que, apesar de variarem consoante o queijo, podem ser resumidas como se indica na Figura 1.6.

Os produtos artesanais, em particular os lacticínios tradicionais, possuem um valor intrínseco extremamente elevado, devido não apenas à riqueza das suas propriedades organolépticas e equilíbrio nutricional, mas igualmente ao facto da sua tecnologia de fabrico resultar de centenas de anos de evolução de práticas ancestrais, através da experiência empírica de inúmeras gerações. Por outro lado, a produção de lacticínios

artesanais, como é o queijo, tem para o desenvolvimento sócio-económico das populações rurais uma importância crescente (Malcata e Macedo, 1994).

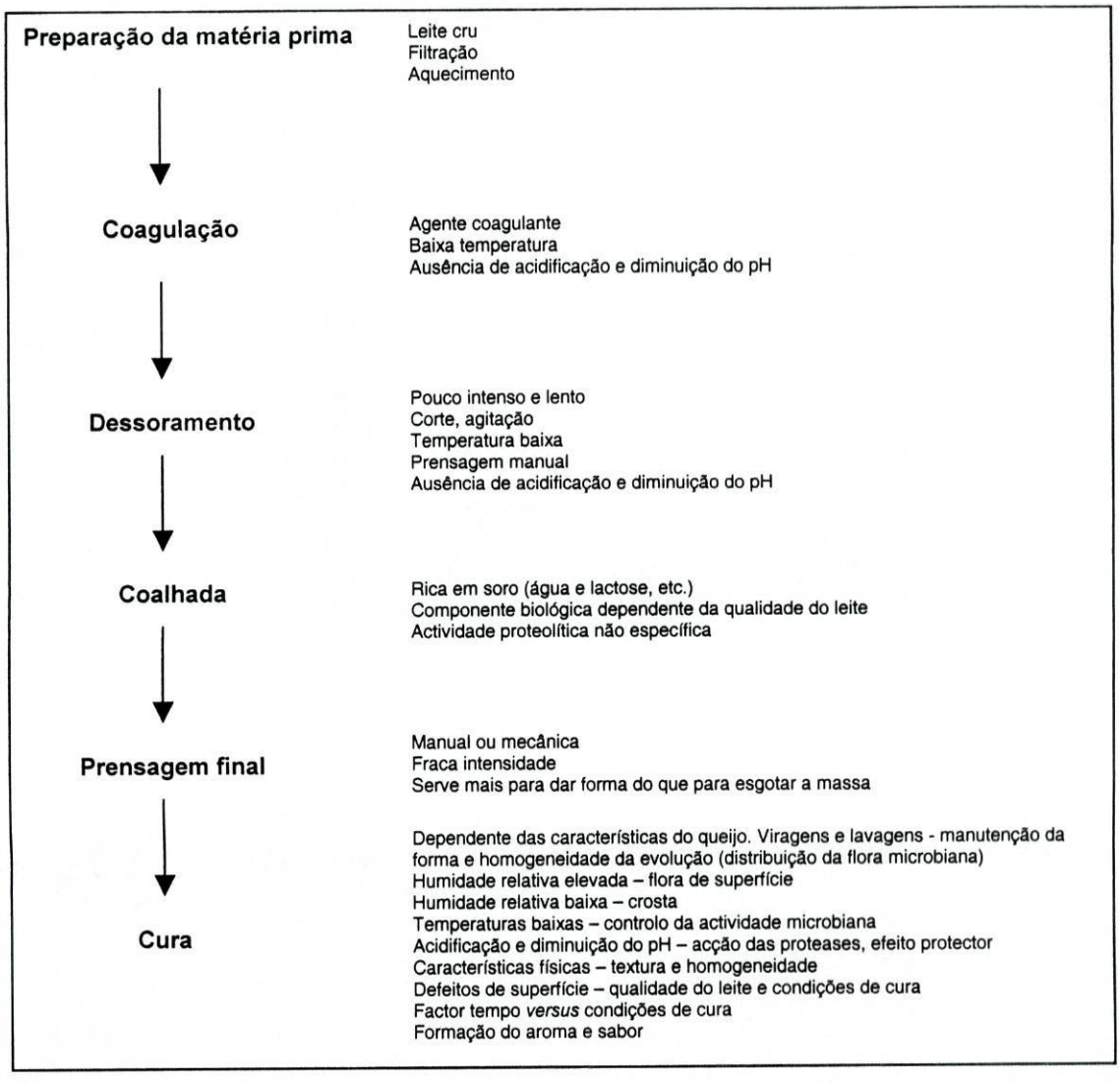


Figura 1.6. – Diagrama tecnológico tradicional genérico para o fabrico de queijo (adaptado de Martins *et al.*, 2000).

À semelhança de diversos países europeus, Portugal adoptou o mecanismo de Denominação de Origem Protegida (DOP) para defender as designações originais dos seus queijos mais típicos. A produção dos queijos tradicionais portugueses avalia-se em cerca de 15 000-20 000 toneladas por ano, admitindo-se que apenas 10 a 15% desta produção seja controlada pelos organismos de Controlo e Certificação de queijos de ovelha, cabra e mistura com DOP. Em Portugal, podem usar o nome específico da DOP os seguintes

queijos: Queijo de Azeitão, Queijo de Cabra Transmontano, Queijo de Évora, Queijo de Nisa, Queijo de São Jorge, Queijo Rabaçal, Queijo Serpa, Queijo Serra da Estrela, Queijo Terrincho e Queijo da Beira Baixa. As características dos queijos são influenciadas pelas características do leite utilizado na sua produção, dos microrganismos presentes, do tipo de fermentação, pela raça do animal e sua alimentação, dependendo do clima ou da época do ano e da tecnologia de produção (Canada, 1998; Mendia *et al.*, 2000).

Os pequenos ruminantes, e em particular os ovinos, ocupam lugar de destaque na queijaria tradicional portuguesa, considerando-se que a totalidade do leite de ovelha (cerca de 97 000 toneladas) e do leite de cabra (cerca de 42 000 toneladas) é transformada em queijo (Martins *et al.*, 2000).

De entre os queijos com denominação de origem, o Queijo Terrincho, é o que adquire maior relevância no nordeste de Portugal, tendo por isso sido o escolhido neste estudo. É preparado a partir de leite cru de ovelha e a sua produção e processo de maturação tem de se restringir à sua área geográfica que engloba os concelhos de Mogadouro, Alfândega da Fé, Torre de Moncorvo, Freixo de Espada à Cinta, Mirandela, Vila Flor, Carrazeda de Ansiães, Macedo de Cavaleiros, do distrito de Bragança; Valpaços, do distrito de Vila Real; São João da Pesqueira, do distrito de Viseu; e Vila Nova de Foz Coa, Meda e Figueira de Castelo Rodrigo, do distrito da Guarda (Barbosa, 1998).

A ovelha Churra da terra quente, vulgarmente conhecida por "Terrincha" expandiu-se a partir do século XIX, e hoje constitui 98% do efectivo ovino da região. A sua alimentação, em regime de pascigo permanente, é especialmente à base das pastagens naturais e de forragens, de folhagem de freixo, olmo, amendoeira, oliveira, vinha, e também das plantas arbustivas típicas da região como a giesta negral, urze, carqueja e a esteva. É neste quadro natural, com condições ecológicas particulares, associado a um maneio tradicional, que define e mantém a especialidade do queijo produzido pela ovelha churra "Terrincha".

O Queijo Terrincho é um queijo de cura natural controlada que resultou do esgotamento lento da coalhada, após coagulação do leite de ovelha cru extreme, com coalho de origem animal. Apresenta-se sob a forma de cilindro baixo, tipo "prato", regular, com algum abalamento lateral nas faces sem bordos definidos. A crosta é maleável, bem formada, lisa de coloração amarelo palha clara e uniforme. O diâmetro pode variar entre 13

a 20 cm e altura entre 3 e 6 cm, situando-se o seu peso entre 800 e 1200 g. A sua maturação deve ser feita em locais de cura natural ou em instalações de ambiente controlado durante 30 dias, com temperatura entre 5 a 12 ºC e humidade relativa entre 80 e 85%. O teor de gordura no extracto seco varia entre 45 a 65% e humidade referida ao queijo isento de matéria gorda varia entre 55 e 63%. A textura deste queijo é fechada e uniforme, com pasta ligeiramente untuosa, com alguns olhos, e por vezes deformável. O seu sabor é suave, limpo e muito característico (Salino, 1994; Barbosa, 1998; Canada, 1998).

A procura deste queijo tem vindo a aumentar nos últimos anos, por exemplo entre 1996 e 1997 a sua produção aumentou de 3342 para 6626 kg (Martins *et al.*, 2000).

A autenticidade dos queijos tradicionais reveste-se de grande importância pois, o aumento da sua competitividade passa pela satisfação das exigências cada vez maiores dos consumidores que adquirem este tipo de produto, atendendo ao seu lado tradicional, ao seu sabor e características únicas.

Durante a maturação do queijo observa-se uma série de acontecimentos bioquímicos, nomeadamente a proteólise, a degradação de gordura e hidratos de carbono, cruciais para o desenvolvimento do sabor e da textura (Fox, 1989b; Sousa e Malcata, 1997). Nem todas as enzimas proteolíticas são coagulantes do leite. As coagulantes são geralmente da classe das proteases acídicas, que têm uma elevada actividade específica na κ-caseína (Dalgleish, 1992). No queijo, os agentes proteolíticos podem ser provenientes de diversas fontes: i) proteases nativas do leite (p.ex., plasmina); ii) coalho, proveniente do estômago de vitelos jovens não desmamados, constituído geralmente por quimosina ou renina e pepsina, ou, alternativamente, por pepsinas provenientes do estômago de porcos ou galinhas, por proteases aspárticas de origem vegetal (p.ex., provenientes das flores de *Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*), ou ainda por proteases ácidas (p.ex., de *Rhizomucor miehei*, *R. pusilus* ou *Cryphonectria parasitica*) e iii) proteases e peptidases de microrganismos constituintes das culturas lácteas de arranque (p.ex., *Lactococcus thermophilicus*, e espécies de *Streptococcus* e *Lactobacillus*) ou microrganismos secundários associados com o desenvolvimento de características específicas (p.ex., espécies de *Propionibacterium*, *Brevibavterium linens*, leveduras e fungos), deliberadamente adicionadas, ou já presentes como resultado de contaminação ambiental (Fox, 1989b; Fox *et al.*, 1996; Sousa e Malcata, 1997; Fox e McSweeney, 1998).

Uma fase essencial do fabrico dos queijos é a proteólise parcial da caseína durante a maturação, transformando-se a proteína insípida e insolúvel em produtos sápidos e solúveis, que são os principais responsáveis pela alteração de textura e desenvolvimento de aromas e *flavour* dos queijos. A proteólise primária das caseínas é catalisada, principalmente pelas proteases contidas no coalho, sendo a renina a mais importante. Consiste na quebra da ligação Phe^{105}-Met^{106} da κ-caseína, originando a *para*-κ-caseína e o glicomacropéptido, o que provoca uma desestabilização micelar e consequentemente a coagulação do leite. As enzimas actuam também nas restantes caseínas, α e β-caseínas, presentes nas micelas. São originados péptidos de peso molecular elevado e médio, que são posteriormente degradados em pequenos péptidos e aminoácidos por proteases e peptidases provenientes das culturas lácteas de arranque ou das culturas secundárias. Das caseínas, a α_{s1}–caseína, é a primeira a ser hidrolisada e geralmente a mais extensamente degradada (Grappin *et al.*, 1985; Rank *et al.*, 1985; Fox *et al.*, 1996; Sousa e Malcata, 1997). Estes compostos resultantes da proteólise das caseínas são constituintes importantes que afectam a qualidade do queijo (Jin e Park, 1996; Michaelidou *et al.*, 1998). As proteínas são hidrolisadas em diferentes locais durante a maturação perdendo, a matriz proteica, parte da sua estrutura original, alterando assim as propriedades reológicas do queijo.

Ensaios electroforéticos das caseínas do queijo poderão ser usados como ensaios semi-quantitativos do teor de proteínas intactas durante diferentes períodos de maturação, servindo estes como índices de maturação, permitindo, assim, a sua correlação com certas propriedades do queijo. É de realçar que, a maior parte dos péptidos visíveis na electroforese em gel de poliacrilamida do queijo são insolúveis a pH 4,6 e a quantidade total dos mesmos deverá estar relacionada com os compostos azotados coaguláveis a esse pH. Um outro ponto de interesse é a acentuada variação da proporção relativa de vários compostos durante a maturação consoante os tipos de queijo. No entanto, ainda não se conseguiu entender completamente o significado dessas alterações em relação às propriedades reológicas e sensoriais do queijo. A intensidade dos aromas parece estar fortemente relacionada com os compostos azotados solúveis, em especial os aminoácidos e os pequenos péptidos (Grappin *et al.*, 1985). Quantidades excessivas de péptidos hidrofóbicos podem ser produzidas originando sabores amargos. Contudo, em concentrações adequadas, e quando associados a outros compostos, esses péptidos amargos podem contribuir

positivamente para o *flavour* do queijo (Fox e MacSweeney, 1998). Pensa-se também, que os compostos resultantes da hidrólise das caseínas podem ser considerados como marcadores dos processos tecnológicos, utilizados na produção de um queijo ou família de queijos. Assim, nos queijos italianos e tipo suíço, a maior parte dos péptidos identificados resultam da hidrólise da β-caseína, o que indica que a proteólise primária é devida fundamentalmente à plasmina. Foram ainda identificados alguns péptidos que derivam da α_{s2}-caseína, também sensível à acção dessa enzima. Por outro lado, no queijo *Cheddar*, a proteólise primária poderá ser principalmente explicada pela acção da renina na α_{s1}-caseína e pela plasmina na β-caseína, enquanto que em queijos frescos, como o queijo alemão *Quarg*, a acção preponderante é das bactérias lácticas (Léonil *et al.*, 2000).

A proteólise ainda não foi completamente caracterizada em nenhum tipo de queijo, embora se tenham verificado progressos significativos. Os métodos mais utilizados na avaliação do grau de proteólise podem ser divididos em: i) métodos não específicos, que se baseiam na solubilidade de famílias de compostos azotados em vários solventes e/ou precipitantes (cuja concentração global é posteriormente determinada por espectrofotometria ou titulação de Kjeldahl), que permitem obter uma informação quantitativa condensada sobre a proteólise; e ii) métodos específicos, que se baseiam em técnicas electroforéticas ou cromatográficas (por exclusão molecular, permuta iónica, interacções hidrofóbica e em fase reversa), que permitem resolver individualmente os péptidos e os aminoácidos (Rank *et al.*, 1985; Sousa e Malcata, 1997).

Dependendo do método analítico utilizado no fraccionamento da fracção azotada do queijo são usados vários solventes e/ou precipitantes como é indicado na Tabela 1.5. A extracção com água para quantificar globalmente os compostos azotados é provavelmente o método mais usado no cálculo do índice de maturação. Na realidade, embora as caseínas que constituem a matriz do queijo sejam insolúveis em água, os produtos da sua degradação, os péptidos, tornam-se cada vez mais solúveis à medida que o seu tamanho diminui ao longo da proteólise (Rank *et al.*, 1985; Sousa e Malcata, 1997).

As técnicas não específicas permitem obter informações globais sobre a extensão da proteólise e actividade proteolítica dos vários agentes, no entanto, a caracterização do processo de degradação das caseínas durante a maturação exige o recurso a técnicas que permitam a separação e a detecção de cada péptido formado. De facto, o grau de proteólise

tem vindo a ser avaliado recorrendo, cada vez mais, às técnicas de electroforese e cromatografia, nomeadamente electroforese em gel de poliacrilamida com ureia e cromatografia de alta pressão em fase reversa. De facto, as electroforeses em gel de poliacrilamida com ureia, com SDS e a focagem isoeléctrica têm sido utilizadas no estudo da proteólise das caseínas e da consequente formação de grandes péptidos, contudo, a primeira técnica tem-se mostrado particularmente apropriada para a monitorização dessa proteólise primária. Por outro lado, a electroforese capilar apesar de não ser muito utilizada neste estudo tem grandes potencialidades para ser mais aplicada na análise de péptidos de queijos (Marcos *et al.*, 1979; Addeo *et al.*, 1995; Sousa e Malcata, 1997; Fox e McSweeney, 1998).

Tabela 1.5. – Composição das fracções azotadas obtidas por diferentes métodos de extracção líquida e/ou precipitação (retirado de Sousa e Malcata, 1997).

AGENTES DE EXTRACÇÃO LÍQUIDA/PRECIPITAÇÃO	COMPONENTES NA FRACÇÃO SOLÚVEL
água ácido (pH 4,6) cloreto de cálcio cloreto de sódio	proteínas, péptidos e aminoácidos
clorofórmio-metanol metanol-diclorometano-água	péptidos hidrofóbicos
ácido tricloroacético etanol ácido sulfossalicílico	péptidos e aminoácidos
ácido fosfotúngstico	péptidos pequenos e aminoácidos

A quantificação da formação de péptidos e aminoácidos solúveis em água, a pH 4,6, em ácido tricloroacético, etanol ou ácido fosfotúngstico, ou a medição de grupos de aminoácidos livres por reacção com a ninidrina, o-ftaldialdeído, trinitrobenzeno ou a fluorescamina, é útil para a monitorização da proteólise secundária. A cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa é especialmente aplicada na análise do perfil peptídico e quantificação dos aminoácidos formados durante a maturação. Embora com menos frequência, são também usadas, a cromatografia líquida de alta pressão por permuta

iónica e por exclusão molecular (Jin e Park, 1995; Sousa e Malcata, 1997; Fox e McSweeney, 1998; Pavia *et al.*, 2000).

Christensen *et al.* (1989) estudaram a degradação da α_{s1} e β-caseínas num extracto de queijo dinamarquês *Danbo* por HPLC *(High Pressure Liquid Chromatography)* em fase reversa, tendo concluído que existe maior degradação da α_{s1}-caseína do que da β-caseína, e que esta última só é ligeiramente degradada durante as primeiras 6 semanas de maturação, aparentemente pela acção da plasmina, levando à produção das γ-caseínas. Addeo *et al.* (1992, 1994) caracterizaram alguns péptidos da fracção solúvel a pH 4,6 após resolução dessa fracção com 12% de ácido tricloroacético. Foram separados os péptidos insolúveis e solúveis em 12% de ácido tricloroacético por HPLC em fase reversa, os quais foram por sua vez identificados por espectrometria de massa com bombardeamento atómico rápido. Estes autores concluíram que a maioria dos péptidos encontrados durante a maturação do queijo *Parmigiano-Reggiano* são também produtos da proteólise da β e α_{s1}-caseínas, identificando, alguns, como sendo péptidos bioactivos. Num estudo semelhante, Ferranti *et al.* (1997) identificaram e separaram fosfopéptidos produzidos durante a maturação do queijo *Grana Padano*, por HPLC em fase reversa. Por outro lado, Gaiaschi *et al.* (2000) estudaram o perfil de degradação da α-caseína durante a maturação deste mesmo queijo, usando a electroforese em gel de poliacrilamida com SDS e *immunoblotting*. Estes demonstraram que o perfil de proteólise da α-caseína pode ser usado como um marcador de maturação do queijo *Grana Padano*. Deste modo é possível evitar a comercialização deste queijo com tempo insuficiente de maturação, uma vez que, necessita de um período de maturação de 12 meses até adquirir a qualidade organoléptica e nutricional característica.

1.3. CONTROLO DA QUALIDADE DOS LACTICÍNIOS

A autenticidade dos alimentos tornou-se um problema global. É cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos fraudulentamente rotulados e de produtos de qualidade inferior, quer por razões económicas, quer por razões de saúde pública.

As adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas são relativamente frequentes e diversificadas. Um tipo de fraude que deverá ser detectado é a presença de produtos não conformes com a rotulagem. Por exemplo, o consumo de produtos que contenham leite e este não seja declarado na rotulagem, poderá causar reacções alérgicas, em indivíduos sensíveis, a esse produto (García *et al.*, 1991). Por outro lado, a avaliação da qualidade dos produtos lácteos deverá também incluir a detecção de compostos resultantes da degradação das proteínas. Por exemplo, a detecção de péptidos presentes em leite UHT recentemente processado, poderá indicar que foi obtido a partir de leite de qualidade duvidosa. Por outro lado, a formação de péptidos durante o armazenamento de produtos de longa duração, poder-se-á dever à presença de enzimas termicamente resistentes, que frequentemente provocam deterioração da qualidade desses produtos. Poder-se-á também, analisar o grau de desnaturação das proteínas do soro, para avaliar a severidade do tratamento térmico utilizado, uma vez que este pode levar a uma importante perda da qualidade nutricional (Andrews, 1983; López-Fandiño *et al.*, 1993; Recio *et al.*, 1996, 1997).

As flutuações sazonais na disponibilidade do leite de cabra e de ovelha e o preço mais elevado comparativamente ao leite de vaca são um incentivo, para que os produtores de queijo adulterem os queijos tradicionais, de leite de cabra e de ovelha, com leite de vaca e proteínas do soro (Beer *et al.*, 1996; Cattaneo *et al.*, 1996a; Haza *et al.*, 1996; Plath *et al.*, 1997). Deste modo, a possibilidade de determinar a matéria prima (tipo de leite) que foi utilizado na produção de queijos, tem grande importância, não só para garantir a genuinidade dos queijos com denominação de origem, e dos queijos fabricados com leites puros, mas também na determinação das percentagens de leite em queijos de mistura. Assim, por razões éticas e económicas torna-se imperativo o desenvolvimento de métodos sensíveis para a detecção dos vários tipos de leites em produtos lácteos e não lácteos.

Um grande número de métodos têm sido utilizados no doseamento quantitativo das proteínas do leite: proteínas totais, caseínas e proteínas do soro. As diferenças de comportamento que apresentam permite a sua separação e doseamento. No entanto, como se trata de compostos complexos e cuja quantidade é variável, o seu doseamento é difícil e muitas vezes apenas aproximado. Por outro lado, o grande desenvolvimento e aparecimento de novos tratamentos tecnológicos dos produtos lácteos dificulta ainda mais

a sua determinação quantitativa. No leite, a determinação da quantidade de proteínas totais faz-se, normalmente, pelo método de Kjeldahl (Grappin e Horwits, 1988; Barbano *et al.*, 1990, 1991; Vaz, 1999), por fixação de corantes (Mabon e Brechany, 1982; Grappin e Ribadeau-Dumas, 1992) ou por espectrometria no infravermelho (Barbano e Dellavalle, 1987; Rodrígues-Otero *et al.*, 1995; Rodrígues-Otero e Hermida, 1996) e ultravioleta (Church *et al.*, 1983, Meisel, 1995). O método por fixação de corante, principalmente o Negro de Amido, e a espectrofotometria no infravermelho são os mais utilizados nos laboratórios de controlo de qualidade da indústria de lacticínios, uma vez que, são simples, rápidos, económicos e podem ser utilizados por pessoas pouco especializadas.

A cromatografia, a electroforese e os ensaios imunológicos têm sido as técnicas mais adequadas para avaliar a qualidade e autenticidade dos produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. O desenvolvimento de cromatografias rápidas, FPLC *(Fast Protein Liquid Chromatography)* e HPLC, e de electroforese capilar, abriu novas perspectivas para a diminuição dos tempos de análise.

Mais recentemente, com a técnica de PCR *(Polimerase Chain Reaction)* também se têm obtido resultados promissores (Plath *et al.*, 1997; Mendes *et al.*, 1999a, 1999b). Os ensaios imunológicos serão, certamente mais utilizados na tecnologia dos lacticínios, quando estiverem disponíveis comercialmente anticorpos mais baratos e específicos (García *et al.*, 1990, 1991; Beer *et al.*, 1996; Haza *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 1997). Com estas técnicas têm-se conseguido análises bastante eficientes em vários tipos de leites e produtos lácteos simples, como leites pasteurizados e esterilizados, caseinatos e soros. No que respeita a produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes, nos quais ocorreu já uma degradação das proteínas, torna-se mais complexa e difícil a separação, quantificação e identificação das diversas proteínas.

O estudo das proteínas do leite e dos diferentes métodos de análise que permitem realçar aspectos como o polimorfismo genético e não genético das proteínas, a avaliação dos tratamentos tecnológicos, detecção de adulterações e avaliação da proteólise, adquirem uma importância cada vez maior no controlo da qualidade na indústria de lacticínios.

1.3.1. Métodos de cromatografia líquida

A cromatografia é fundamentalmente um processo de separação por migração diferencial entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária, sendo estabelecidas interacções entre os solutos e a fase estacionária (electrostática, hidrofóbica, de afinidade e estereoquímicas), consoante o tipo de cromatografia (Prazeres, 1995).

A cromatografia por permuta iónica constitui um dos métodos cromatográficos mais utilizados na purificação de proteínas. As cromatografias por permuta aniónica e catiónica têm sido utilizadas com sucesso na separação das várias proteínas do leite (Manji *et al.*, 1985; Léonil e Mollé, 1991). Utilizando uma coluna de permuta aniónica *Pharmacia* Mono Q, Andrews *et al.* (1985) separaram a γ, κ, α_{so}, α_{s1} e α_{s2}-caseínas, aplicando uma eluição por gradiente de NaCl (0-0,35 M), em tampão contendo ureia 4,5 M e β-mercaptoetanol 10 mM, a pH 7. Os mesmos autores descrevem a separação de imunoglobulinas, β-lg A e B, α-la, BSA e ácido orótico com essa coluna. Estes autores conseguiram uma boa separação das proteínas do soro com o mesmo gradiente de NaCl utilizado para as caseínas, mas sem a presença de ureia e de β-mercaptoetanol. A análise simultânea das proteínas do soro e das caseínas não foi conseguida, uma vez que, a ureia necessária para dissociar as caseínas, faz com que a resolução de separação das proteínas do soro seja muito pequena.

A cromatografia clássica em coluna DEAE-celulose utilizando β-mercaptoetanol e ureia e, aplicando gradientes de NaCl, é a mais frequentemente utilizada na separação das caseínas. Num artigo de revisão, Strange *et al.* (1992) referem que alguns autores conseguiram separar, com esta coluna cromatográfica e gradiente de NaCl, a κ-caseína B, depois de isolada por precipitação. Referem ainda, que outros autores, usando tampão com ureia 3,3 M e β-mercaptoetanol obtiveram uma boa separação das caseínas numa coluna DEAE-Sepharose. Strange *et al.* (1992) referem também que a AE-FPLC (*Anion-Exchange-Fast Protein Liquid Chromatography*) consegue separar caseínas bovinas de caseínas não bovinas e que a análise de péptidos provenientes das caseínas tem uma menor resolução quando comparada com outras técnicas cromatográficas. De facto, Kaminarides e Anifantakis (1993) conseguiram a separação das diferentes fracções de caseínas que

compõem o leite de vaca, ovelha e cabra por HPLC com uma coluna de permuta aniónica (P.L.–SAX 8μ 1000A) e detecção no UV a 280 nm. Os leites de ovelha e cabra apresentaram perfis cromatográficos relativamente parecidos, mas que diferiam consideravelmente do leite de vaca. A eluição da α_{s1}-caseína bovina ocorre mais tarde que a das α_{s1}-caseínas caprina e ovina, utilizando as mesmas condições cromatográficas. Deste modo, é possível detectar e quantificar a presença de leite de vaca em leite de ovelha e cabra. A quantidade de leite de vaca adicionado em amostras adulteradas poderá assim ser calculada por integração da área dos picos de α_{s1}-caseina bovina, usando uma curva padrão preparada previamente com amostras adulteradas de composição conhecida.

As condições de separação e análise das caseínas através de cromatografia de permuta catiónica não estão tão bem definidas como na cromatografia de permuta aniónica. Contudo, estudos recentes mostraram que é possível a determinação de algumas variantes da β-caseína (Hollar *et al.*, 1991). Andrews *et al.* (1985) utilizando uma coluna Mono S e eluição por gradiente de NaCl (0-0,3 M), com tampão de ureia a pH 3,8, conseguiram uma boa separação da γ, κ, β, α_{s1} e α_{s2}-caseínas. No entanto, os autores não conseguiram, com esta coluna, separar as proteínas do soro. Mayer *et al.* (1997) desenvolveram um método de HPLC por permuta catiónica que permite separar a *para*-κ-caseína bovina, ovina e caprina permitindo assim determinar a percentagem de leite de vaca, cabra e ovelha em queijos de mistura. Para o efeito utilizaram uma coluna Shodex IEC CM-825 sendo a eluição feita por gradiente de NaCl (0-0,5 M), em tampão de ácido malónico-ureia 10 mM, a pH 6.

Uma das maiores dificuldades da cromatografia por exclusão molecular é a detecção e avaliação do tamanho das micelas de caseína. Esta cromatografia não separa eficazmente estas proteínas em virtude da proximidade dos seus pesos moleculares. Por outro lado, é utilizada com sucesso no isolamento das proteínas menores do soro do leite (Shimazaki e Sukegawa, 1982; Strange *et al.*, 1992). Gupta (1983) descreve um método de GF-FPLC (*Gel Filtration-Fast Protein Liquid Chromatography*) com uma coluna TSK 3000, para determinar a composição em proteínas, no estado nativo e/ou desnaturado, de produtos lácteos. No entanto, nas condições utilizadas, a α e a β-caseínas eluíram como um único pico e a κ e γ-caseínas eluíram na mesma posição que a β-lg e a α-la, respectivamente. O erro associado à quantificação das proteínas, quer no estado nativo, quer no estado

desnaturado foi de ± 10%. Andrews *et al.* (1985) conseguiram separar eficazmente as proteínas do soro com uma coluna Superose 12 em FPLC, não conseguindo a separação das caseínas, uma vez que, estas apresentam pesos moleculares muito próximos. Utilizaram uma eluição isocrática com tampão Tris-HCl 0,1 M, com NaCl 0,5 M e NaN_3 10 mM, a pH 7. Strange *et al.* (1992) referem que com esta cromatografia não é possível a separação das variantes genéticas da β-lg. Por outro lado as semelhanças de peso molecular das proteínas do soro das várias espécies, impedem também a utilização desta técnica na identificação dos vários tipos de leite.

A cromatografia clássica de interacções hidrofóbicas é normalmente aplicada na purificação das proteínas menos abundantes presentes no soro do queijo, sendo também utilizada na separação das proteínas dos glóbulos de gordura. HI-HPLC (*Hydrophobic Interaction-High Pressure Liquid Chromatography*) é um método atractivo de isolamento das caseínas uma vez que estas são extremamente hidrofóbicas (Strange *et al.*, 1992). Chaplin (1986) propõe um método de HI-FPLC utilizando uma coluna Phenyl-Superose. Este autor conseguiu separar as γ, κ, β, α_{s1} e α_{s2}-caseínas, com um gradiente decrescente de fosfato de sódio de 0,8 a 0,05 M em tampão contendo ureia 3,75 M, a pH 6. Com esta coluna foi também possível separar as proteínas do soro usando, no entanto, um eluente diferente, com um gradiente decrescente de 1,5 a 0 M de sulfato de amónio em 0,05 M de fosfato de sódio, a pH 7. O método desenvolvido por Ferreira *et al.* (2000, 2001) permite a quantificação das caseínas em leites de alimentação infantil com um limite de detecção de 0,02 mg/ml. Este método foi ainda utilizado para avaliar a extensão da desnaturação das proteínas do soro devido a tratamentos térmicos.

De acordo com os diversos trabalhos publicados na literatura é sabido que as colunas C_4, C_8 e C_{18}, utilizadas em cromatografia de fase reversa, permitem separar as caseínas, (Carles, 1986; Strange *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1991, 1995), as proteínas do soro (Parris e Baginski, 1991; Urbanke *et al.*, 1992; Bobe *et al.*, 1998) e péptidos derivados (Bican, 1983; Tieleman e Warthesen, 1991; Haileselassie *et al.*, 1999). Contudo, na literatura é possível também encontrar referência à utilização de outro tipo de colunas aplicadas ao estudo destas proteínas, nomeadamente colunas de poliestireno divinilbenzeno (Li-Chan *et al.*, 1992; Elgar *et al.*, 2000).

Voirin *et al.* (1991) sugeriram um método que poderá ser utilizado em laboratórios de controlo da qualidade do leite e que se baseia na análise de péptidos marcadores da

proteólise do leite. Estes autores conseguiram separar vários péptidos provenientes da proteólise do leite utilizando uma coluna C_{18} e eluição por gradiente com solvente A: ácido trifluoracético (TFA)-água 0,1% (v/v) e solvente B: TFA-acetonitrilo-água 0,1% (90:10 v/v). Visser *et al.* (1991) descrevem um método RP-HPLC (*Reversed-phase High Pressure Liquid Chromatography*) com uma coluna HiPore RP-318 e pré-coluna C_{18} para separar as proteínas do leite em pó, que permite identificar simultaneamente as várias caseínas, α-la e β-lg, embora a α-la B elua no mesmo tempo da β-caseína B.

A técnica de RP-HPLC tem sido também usada na separação e identificação de péptidos em queijos, permitindo, assim, um controlo de qualidade deste produto. Os péptidos contribuem para o sabor e aroma do queijo e o seu estudo permite estimar a "idade", o tipo de leite e de coalho utilizado na produção do queijo (Kaminogawa *et al.*, 1986; Strange *et al.*, 1992). Pham e Nakai (1984) aplicaram a análise discriminante aos dados obtidos por HPLC em fase reversa correspondentes a amostras de queijo *Cheddar* ao longo da maturação. Utilizaram uma coluna C_8 *Adsorbosphere* e eluição isocrática com tampão fosfato 0,1 M, a pH 6. Recorrendo a esta técnica, Lau *et al.* (1991) utilizaram uma coluna UKB UltroPac TSK ODS-120T e uma pré-coluna UltroPac Lichrosorb RP18. A razão entre as concentrações molares de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos, foi utilizada com o intuito de distinguir queijos *Cheddar* fabricados com leite cru e com leite pasteurizado, tendo verificado que estes últimos apresentavam um valor superior.

1.3.2. Métodos electroforéticos

A electroforese teve e continua a ter um papel muito importante no estudo das proteínas do leite, tendo sido utilizada na investigação das suas variantes genéticas. De facto, a designação das caseínas derivou da análise por electroforese, sendo os componentes menores da caseína, γ^1, γ^2, γ^3 e *para*-κ-caseína descobertos por este método (Strange *et al.*, 1992). A principal vantagem do método de electroforese é a de permitir a separação, quantificação e identificação simultânea das diferentes proteínas de uma mistura. Após a separação, as diferentes bandas resultantes podem ser identificadas com a utilização de corantes como o azul de Coomassie ou o nitrato de prata. Estes permitem, não

só, uma identificação qualitativa dos grupos de proteínas, como também uma quantificação aproximada utilizando um densitómetro, no comprimento de onda correspondente à absorção do corante (James, 1995).

Furtado (1983) desenvolveu uma técnica de electroforese em gel de poliacrilamida que permite detectar percentagens de leite de vaca em leite de cabra pasteurizado superiores a 5%, tendo em conta a diferente mobilidade da α_{s1}-caseína. Vários autores descrevem métodos onde utilizam três separações electroforéticas diferentes para cada amostra, de modo a obter resultados mais facilmente interpretáveis: a análise das caseínas de amostras de leite ou de caseína precipitada a pH 4,6, é feita em pH alcalinos e ácidos, com ureia e um agente redutor, enquanto que a análise das proteínas do soro de amostras de leite ou de soro ácido é feita em pH alcalino sem ureia e agente redutor (Chianese *et al.*, 1992; Grappin e Ribadeau-Dumas, 1992). Esta metodologia permite uma boa separação de variantes genéticas e a detecção de diferentes graus de fosforilação das proteínas do leite (Strange *et al.*, 1992).

A electroforese em gel de poliacrilamida com ureia foi utilizada por Farkye *et al.* (1991) com vista à avaliação da proteólise do queijo *Mozzarella* durante o armazenamento, conseguindo detectar a degradação da α e β-caseínas com o inerente aumento das γ-caseínas. Uma técnica semelhante foi usada por Carretero *et al.* (1994) no estudo da proteólise das caseínas durante a maturação de queijos de cabra, tendo constatado que a β-caseína é resistente à hidrólise uma vez que 50% dessa proteína se mantém inalterada durante a maturação.

Uma das vantagens da electroforese é a sua sensibilidade para detectar adulterações. A adição de leite de vaca em queijos de ovelha foi quantificada por electroforese em gel de poliacrilamida por Amigo *et al.* (1991). Estes autores utilizaram a análise electroforética das proteínas do soro para detectarem esta adulteração e compararem o comportamento dessas proteínas. O corante utilizado foi o nitrato de prata e conseguiram detectar quantidades de leite de vaca da ordem de 1% nos queijos. Este método tem a vantagem de permitir analisar as proteínas do soro que são menos susceptíveis à proteólise do que as caseínas. Aquelas, embora presentes em concentrações muito reduzidas, permanecem inalteradas após 5 meses de maturação dos queijos. No entanto, os autores verificaram que o aquecimento do leite de vaca a 90 °C durante 30 minutos desnatura as proteínas do soro, não permitindo detectar a adição de percentagens de leite de vaca inferiores a 10%. O

procedimento parece ser simples e de baixo custo. Mais recentemente, Mayer e Hörtner (1992, 1995) utilizaram a electroforese em gel de poliacrilamida para separar a β-caseína e assim determinar a presença das caseínas bovinas em produtos lácteos.

Bash *et al.* (1985) desenvolveram um método SDS-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate*) que permite quantificar as caseínas e as proteínas do soro em leite processado líquido e em pó. Este método poderá permitir a detecção de adulterações do leite por concentrados de proteínas do soro ou leite desnatado em pó. Strange *et al.* (1992) referem que este método tem sido também utilizado para estudar e caracterizar a proteose-peptona. Recentemente, Casper *et al.* (1998) utilizaram SDS-PAGE para determinar a composição das proteínas do soro em leite de cabra e de ovelha.

A focagem isoeléctrica, que permite a separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoeléctrico, é particularmente apropriada para a análise de caseínas, uma vez que, estas apresentam diferentes variantes genéticas, quer na mesma espécie quer em espécies diferentes. Este método foi também utilizado com sucesso na detecção de alterações provocadas pelos tratamentos térmicos nas proteínas do soro (Strange *et al.*, 1992).

A electroforese bidimensional é utilizada para se conseguir uma melhor separação de misturas proteicas extremamente complexas (Addeo *et al.*, 1988; Grappin e Ribadeau-Dumas, 1992; Kim e Jimenez-Flores, 1994). A focagem isoeléctrica, normalmente em gel em tubo, seguida por uma electroforese de SDS-PAGE em placa, permite uma maior diferenciação das caseínas e das proteínas do soro do leite e de outros produtos lácteos (Strange *et al.*, 1992). Segundo a revisão feita por Grappin e Ribadeau-Dumas (1992) é possível separar não só as caseínas como também a *para*-κ-caseína, a β-lg e a α-la.

A electroforese capilar é uma técnica analítica versátil e sensível que apareceu no final dos anos 80. A sua aplicação caracteriza-se por reduzidos tempos de análise, pequenas quantidades de amostra e baixos custos (James, 1995; Kemp, 1998).

A electroforese capilar tem provado ser uma técnica eficiente na análise das proteínas do leite e na avaliação da qualidade dos produtos lácteos. Existem diversos trabalhos que descrevem a sua utilização na análise de polimorfismos das proteínas, na avaliação da extensão dos tratamentos térmicos, na detecção de adulterações e de péptidos derivados das proteínas durante a proteólise no leite e seus derivados (Chen e Zang, 1992; Jong *et al.*, 1993;

Recio e Olieman, 1996; Cattaneo *et al.*, 1996a, 1996b; Recio *et al.*, 1997; Izco *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2000). Os tipos de electroforese capilar mais utilizados nestas análises são a electroforese capilar de zona, a electroforese capilar em gel e a focagem isoeléctrica capilar (Kemp, 1998).

Cattaneo *et al.* (1996a) utilizaram a electroforese capilar de zona para detectar os diferentes tipos de leite em misturas de leite de vaca, ovelha e cabra. Cada tipo de leite originou um electroferograma típico, permitindo a sua identificação. O método desenvolvido por estes autores permitiu a detecção de 8% e 1% de leite de vaca adicionado a leite de ovelha e cabra, respectivamente, de acordo com os diferentes tempos de migração da α_{s1}-caseína de cada espécie. Por outro lado, Cartoni *et al.* (1999) utilizaram a mesma técnica para determinar a adulteração de produtos de leite de cabra com leite de vaca. A detecção e quantificação do leite de vaca foi obtida pela presença da α-la e β-lg A e B. Estes autores conseguiram detectar 2% de leite de vaca em misturas dos dois tipos de leite e 4% em queijos. Com este método estes autores apenas conseguiram uma análise qualitativa de misturas de leite de vaca, cabra e ovelha e de misturas de leite de cabra e ovelha, devido à sobreposição dos picos referentes à α-la do leite de cabra e ovelha.

A combinação de baixos custos, tempo de análise reduzido e pequeno volume da amostra, fazem da electroforese capilar um instrumento válido na análise das proteínas do leite e controlo da qualidade dos produtos lácteos. Os recentes progressos que permitem acoplar a esta técnica métodos de detecção como a espectrometria de massa, detecção electroquímica, etc., poderão aumentar os limites de detecção e torná-la equivalente ao HPLC (Recio *et al.*, 1997).

1.4. OBJECTIVOS

A importância nutricional e funcional das proteínas do leite associada à sua grande diversidade explicam o elevado interesse no estudo da composição desta fracção. No entanto, apesar dos trabalhos de investigação nesta área serem relativamente numerosos, o conhecimento actual sobre a desnaturação das proteínas e as várias reacções químicas que podem ocorrer durante o processamento do leite e de produtos derivados, nomeadamente

nos queijos, as quais provocam modificações das proteínas, é ainda escasso. Por exemplo, a grande variedade de queijos com diferentes características microbiológicas e bioquímicas, aliada aos diferentes factores que podem afectar o processo de maturação, faz com que os resultados obtidos para um dado tipo de queijo, possam não ser aplicados a outra variedade. Torna-se, por isso, relevante a implementação e validação de diferentes metodologias analíticas que permitam garantir a genuinidade dos queijos que têm leite de ovelha ou cabra como ingredientes, com base na identificação de marcadores de autenticidade, químicos e biológicos. Deste modo, é premente o aperfeiçoamento dos métodos de análise. Este facto, motivou a implementação de metodologias analíticas que permitissem a separação e a quantificação das proteínas do leite de vaca e posterior aplicação ao estudo de leite de outras espécies e de produtos lácteos. Entre os métodos fisico-químicos utilizados para estudar misturas de leite de ovelha, cabra e vaca, as técnicas cromatográficas em fase reversa e a electroforéticas em gel de poliacrilamida apresentam elevada sensibilidade não requerendo reagentes especiais, nem equipamento muito dispendioso.

O RP-HPLC está descrito na literatura como um dos métodos mais adequados para a separação de misturas complexas de macromoléculas biológicas, apresentando um elevado grau de sensibilidade, resolução e reprodutibilidade. Como anteriormente referido, é um método de grande aplicação na separação de caseínas (Mora-Gutierrez *et al.*, 1991; Strange *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1991, 1995; Bobe *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 2000a), de péptidos derivados (Bican, 1983; Tieleman e Warthesen, 1991; Voirin *et al.*, 1991; Li-Chan *et al.*, 1992; Herraiz *et al.* 1994, Michaelidou *et al.*, 1998; Haileselassie *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2000), e no estudo da proteólise das caseínas durante a maturação do queijo e também na determinação do tipo de leite e coalho utilizado na produção do queijo (Chistensen *et al.*, 1989; Strange *et al.*, 1992).

As electroforeses em géis de poliacrilamida com ureia ou SDS foram propostas a partir de 1963. Tendo em conta que a resolução conseguida por estes dois tipos de electroforese é similar e que a técnica ureia-PAGE é mais facilmente aplicada, esta última tornou-se na técnica *standard* na análise das caseínas (Fox e MacSweeney, 1998).

A electroforese em géis de poliacrilamida tem sido largamente utilizada no estudo da proteólise do queijo ao longo da maturação, embora, apenas os péptidos de maior peso molecular podem ser visualizados. Contudo, é uma técnica muito útil na avaliação do

desaparecimento das caseínas e dos seus produtos primários, principalmente quando são usados diferentes tipos de coagulantes ou leites de diferentes espécies (Grappin *et al.*, 1985; Ruiz e Redondo, 1995). Tem sido também aplicada na detecção de leite de vaca em leite e produtos derivados de outras espécies (Furtado, 1983; Amigo *et al.*, 1991; Mayer e Hörtner, 1992).

Assim sendo, o trabalho experimental foi desenvolvido faseadamente tendo em conta as seguintes etapas:

- Separação cromatográfica e quantificação das fracções de caseína bovina. Validação do método para a matriz leite cru e processado;
- Aplicação do método cromatográfico às caseínas ovinas e caprinas;
- Aplicação do método cromatográfico ao estudo de adulterações e proteólise em queijo manufacturado de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho e em queijos comerciais;
- Separação electroforética das caseínas de leite de vaca, de ovelha e de cabra;
- Aplicação do método electroforético ao estudo de adulterações e proteólise em queijo manufacturado de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho e em queijos comerciais.

Deste modo, no trabalho experimental desenvolvido pretendeu-se optimizar e comparar técnicas analíticas, como a RP-HPLC e a electroforese em gel de poliacrilamida com ureia, para separação das caseínas e aplicação no controlo da qualidade de produtos lácteos, pois estas proteínas são as que menos sofrem desnaturação térmica e são as principais proteínas constituintes dos queijos.

Dado que o controlo de qualidade do leite e derivados deve tornar-se cada vez mais rigoroso e frequente, espera-se que com este trabalho se possa dar um pequeno contributo à indústria de lacticínios e às entidades responsáveis por assegurarem a autenticidade destes produtos, uma vez que, necessitam de ter à sua disposição meios que possam dar respostas precisas em tempo real, ao longo das várias etapas de fabrico e comercialização, minimizando os custos decorrentes de qualquer anomalia que possa surgir.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAGEM

2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM FASE REVERSA

2.3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA

2.1. AMOSTRAGEM

Procedeu-se à análise de caseína de leite cru de vaca, da raça Frísia ou Torina, proveniente da região de Braga, de caseína de leite cru de ovelha, da raça Churra (Terrincha) da Terra Quente, da Exploração dos Cortiços (Sr. Artur Esteves), situada no concelho de Macedo de Cavaleiros, distrito de Bragança, e de caseína de leite cru de cabra, da raça Serrana, proveniente do rebanho da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB). A partir destes leites prepararam-se amostras adulteradas de 1, 2, 5, 10 e 20% (v/v) de leite de vaca em leite de ovelha e em leite de cabra. As caseínas resultantes dessas adulterações foram também analisadas.

Foi ainda analisada caseína de leite UHT meio gordo, de leite em pó e de leite do dia meio gordo, obtidos em superfícies comerciais da região do Porto.

Procedeu-se também à análise de caseínas obtidas a partir de 25 queijos: 5 foram obtidos em superfícies comerciais da região do Porto e os restantes 20 preparados, especialmente para o efeito, no Laboratório de Tecnologia Alimentar da ESAB. Estes últimos foram preparados usando a mesma tecnologia de manufactura do fabrico do Queijo Terrincho (Despacho 16/94 de 6 de Janeiro) e analisados com 5, 10, 15, 20 e 30 dias de maturação. De entre os queijos comerciais seleccionou-se: um de leite de vaca pasteurizado, um de leite de cabra pasteurizado, um de leite cru de ovelha (Queijo Terrincho), um de mistura de leite de vaca e ovelha pasteurizados e um de mistura de leite de vaca, ovelha e cabra pasteurizados.

2.1.1. Fabrico dos queijos de acordo com a tecnologia de manufactura do Queijo Terrincho

Seguindo o procedimento usual de fabrico do Queijo Terrincho prepararam-se:

- Cinco queijos de leite cru de ovelha "Terrincha" com peso médio de 69 ± 9,7 g.
- Cinco queijos de leite de vaca meio gordo termizado com peso médio de 82 ± 3,1 g.

- Cinco queijos de ovelha com uma adulteração de 10% de vaca, com peso médio de 61 ± 6,6 g.
- Cinco queijos de ovelha com uma adulteração de 20% de vaca, com peso médio de 68 ± 0,9 g.

Os queijos adulterados foram preparados atendendo aos seguintes aspectos:

- A adulteração foi feita tendo em conta a massa final de queijo obtida e não o volume de cada um dos leites utilizado na sua preparação.
- Em média, para obter 1 kg de queijo são necessários 5 litros de leite de ovelha ou 9 litros de leite de vaca.
- A percentagem mínima de adulteração foi estabelecida atendendo ao interesse comercial. Tendo em conta a produção média anual de Queijo Terrincho de uma queijaria de Trás-os-Montes (4 toneladas) e os preços médios de leite de vaca (50$00/litro) e de ovelha (170$00/litro), uma adulteração de 5% do peso final do queijo corresponderia a um lucro anual adicional da ordem dos 60 000$00. Deste modo, o risco corrido *versus* o lucro obtido não justifica uma adulteração inferior a 10%, a que corresponde um lucro na ordem 160 000$00.
- A percentagem máxima de adulteração foi fixada em 20% tendo em conta que uma adulteração superior seria detectável por um painel de provadores.

Os diferentes queijos foram preparados utilizando as quantidades de leite e de coalho apresentadas na Tabela 2.1. e seguindo o procedimento que a seguir se descreve.

O leite, após ser filtrado, foi aquecido em banho de água à temperatura de coagulação (aproximadamente 35 ºC). A coagulação foi conseguida por adição de coalho de origem animal. O leite foi deixado em repouso até se observar a formação do gel (coalhada) que foi fraccionado com uma espátula até ficar do tamanho de bagos de arroz. De seguida, a coalhada foi colocada num coador onde sofreu uma ligeira pressão facilitando a sinerese do soro, sendo posteriormente introduzida em formas. A transformação da coalhada numa massa compacta, foi conseguida pressionando e virando as formas várias vezes até ao esgotamento do soro. Os queijos foram então retirados das formas sendo colocados à temperatura ambiente numa solução saturada de cloreto de sódio durante 3 horas. Posteriormente, foram armazenados entre 8 a 12 ºC, durante 30 dias, não tendo sido

possível controlar a humidade relativa. Durante esse período de maturação os queijos foram virados e lavados de modo a que a sua crosta ficasse sempre lisa e limpa.

Tabela 2.1. – Quantidades de leite de vaca e ovelha e de coalho animal utilizadas no fabrico dos queijos tipo Terrincho.

Queijo	Coalho animal (ml)	Leite de ovelha (ml)	Leite de vaca (ml)
Ovelha	0,5	1450[i]	---
10% vaca/ovelha	0,6	1500	300
20% vaca/ovelha	0,7	1500	600
Vaca	1,2	---	4000

i: Esta quantidade de leite originou cinco queijos, tendo-se obtido para os restantes leites seis queijos, dos quais apenas cinco foram analisados.

2.1.2. Precipitação das caseínas

As caseínas do leite e do queijo foram extraídas por precipitação com tampão de acetato de amónio 1M a pH 4,3, como a seguir se descreve.

i) Precipitação das caseínas de leite

O leite foi previamente desnatado, sendo para isso, colocado a 8 ºC durante 20 minutos, de modo a facilitar a remoção da sua gordura. Após esse período, procedeu-se a uma centrifugação a 700 g, a 4 ºC, durante 10 minutos. De seguida, removeu-se cuidadosamente, com uma espátula, a gordura que se encontrava na parte superior e procedeu-se a uma nova centrifugação nas mesmas condições. O leite desnatado foi armazenado a –20 ºC até à sua utilização.

A caseína dos vários leites analisados foi obtida, a partir de 15 ml de leite desnatado, por adição de 25 ml de tampão acetato de amónio 1 M, a pH 4,3, à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma centrifugação a 3000 g, a 20 ºC, durante 15 minutos, após a qual se removeu uma pequena camada de gordura e o sobrenadante, de modo a desprezar o soro e outros resíduos de gordura.

De seguida, homogeneizou-se o resíduo de caseína obtido com 25 ml de tampão de acetato de amónio 1 mM, a pH 4,3 e centrifugou-se a 3000 g, a 20 ºC, durante 10 minutos. Desprezou-se novamente o sobrenadante e repetiu-se este procedimento mais duas vezes.

Por fim, a caseína foi lavada com 20 ml de acetona a –20 ºC, e filtrada a suspensão com papel de filtro. O resíduo de caseína retido no filtro foi lavado várias vezes com acetona e depois seco à temperatura ambiente na hotte. Depois de seco foi pesado e guardado num excicador, no frigorífico a 8 ºC.

ii) Precipitação das caseínas do queijo

As amostras de caseína dos vários queijos foram obtidas a partir de 2,5 e 1 g de queijo, para as análises efectuadas por HPLC e por electroforese, respectivamente. Essas amostras, cortadas em forma de "cunha" e após ter sido retirada uma fina camada de casca, foram homogeneizadas inicialmente, num almofariz e de seguida, após adição de tampão de acetato de amónio 1M, a pH 4,3, num homogeneizador Potter. A suspensão resultante foi colocada durante 20 minutos, a 8 ºC.

O restante procedimento foi semelhante ao descrito para a precipitação das caseínas do leite alterando-se apenas a quantidade de tampão acetato de amónio 1 M e 1 mM e a temperatura de centrifugação. Utilizaram-se 30 ml de tampão nas amostras de 2,5 g e 20 ml nas amostras de 1 g de queijo. A centrifugação efectuou-se a 4 ºC.

2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM FASE REVERSA

2.2.1. Padrões e reagentes

Utilizaram-se padrões de caseína inteira de vaca, das fracções α, β e κ-caseínas bovinas e de caseína inteira de ovelha. Estas caseínas foram fornecidas pela Sigma Chemicals Co., com uma pureza de 85% para a α-caseína e caseína inteira de ovelha, 90% para a β-caseína, 80% para a κ-caseína. Para a caseína inteira de vaca a pureza, de 75%, foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) uma vez que, esse valor não era

fornecido pela Sigma. É de realçar que, todas as concentrações referentes às soluções preparadas a partir destes padrões foram corrigidas tendo em atenção o respectivo grau de pureza.

Na preparação dos solventes utilizaram-se reagentes de qualidade analítica sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional. O acetonitrilo (Lichrosolv), foi adquirido à Merck, com uma pureza mínima de 99%. O ácido trifluoracético de pureza mínima de 99%, foi adquirido à Fluka. A água era ultra-pura, tendo sido obtida num sistema de purificação de água Seral (Serapur Pro 90 CN).

Todos os solventes foram filtrados usando membranas Schleider & Schull, de porosidade 0,22 μm, NL 17 e desgasificados sob vácuo, durante pelo menos 15 minutos, antes de serem utilizados.

2.2.2. Equipamento

As análises foram realizadas num sistema cromatográfico constituído por um cromatógrafo marca Gilson, equipado com duas bombas modelo 302 e 305 e um injector manual Rheodyne, modelo 7125, provido de *loop* de 20 μl. A detecção foi feita com um detector UV/Vis Gilson, modelo 118, de comprimento de onda variável e sensibilidade de 0,05 AUFS. Na aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o software Gilson 712.

A separação cromatográfica foi conseguida usando uma coluna cromatográfica *Chrompack* P 300 RP, constituída por um polímero de poliestireno divinilbenzeno (tamanho de partículas 8 μm, de poro 300 Å, 150×4,6 mm d.i.) e uma pré-coluna *Chrompack* P RP (24×4,6 mm d.i.) com o mesmo enchimento da coluna cromatográfica. A coluna foi colocada no interior de um forno marca Jones Chromatography, modelo 7981.

Na desgasificação dos eluentes e preparação das amostras utilizou-se um banho de ultra-sons, marca Bandelin Sonorex RK 100.

2.2.3. Optimização e validação do método para a separação, identificação e quantificação das caseínas de leite de vaca

i) Preparação das amostras

Os padrões e as amostras da caseína precipitada foram preparados dissolvendo as caseínas numa mistura de 70% de uma solução 0,1% de TFA em água (v/v) e 30% de uma solução 95% de acetonitrilo, 5% de água e 0,1% de TFA (v/v). Os padrões e as amostras foram agitados vigorosamente e colocados num banho de ultra-sons até dissolução total. De seguida, foram filtrados usando filtros descartáveis de membranas de mistura de ésteres de celulose, de 0,45 μm de porosidade (Teknokroma TR-200104) e armazenados a -20 °C até serem analisados.

ii) Condições cromatográficas

A separação das diferentes fracções de caseína foi efectuada após a injecção de 20 μl de amostra usando como eluentes 0,1% de TFA em água (v/v) (solvente A) e 95% de acetonitrilo, 5% de água e 0,1% de TFA (v/v) (solvente B). A eluição foi realizada a um fluxo constante de 1 ml/min, à temperatura de 46 ± 0,1 °C. A melhor resolução cromatográfica das caseínas, após terem sido experimentados diferentes gradientes, foi obtida nas seguintes condições: 29% de B durante 5 min, 29% a 37% de B em 5 min, 37% a 41% de B em 2 min, 41% a 42,5% de B em 2 min, 42,5 % de B durante 2 min, 42,5% a 43% de B em 1 min, 43% de B durante 2 min, 43% a 47% de B em 2 min, 47% de B durante 2 min, 47% a 54% de B em 2 min, 54% de B em 2 min, 54% a 100% de B em 1 min, 100% a 29% de B em 2 min, 29% de B durante 5 min. A detecção foi feita a 280 nm.

iii) Identificação das fracções de caseína

As fracções α, β e κ-caseínas foram identificadas com base:

- Na comparação com os tempos de retenção dos respectivos padrões;

- Na relação teórica destas fracções, estabelecida para o leite de vaca como sendo 50:40:10, respectivamente, para a α, β e κ-caseínas (Visser *et al.*, 1991; Jong *et al.*, 1993; Haza *et al.*, 1996 ; Bobe *et al.*, 1998);
- Pelo método da adição de padrão.

iv) Repetibilidade e reprodutibilidade da técnica de HPLC

O estudo da repetibilidade da técnica de HPLC, em relação ao tempo de retenção e à área dos picos cromatográficos, foi efectuado pela análise de uma solução padrão de caseína inteira de vaca, de concentração 1,5 mg/ml. Foram efectuadas 6 injecções consecutivas desta solução, das quais se calculou a média, o desvio padrão (d.p.) e o coeficiente de variação (CV) das áreas e do tempo de retenção (TR) de cada pico.

A reprodutibilidade da técnica foi estudada analisando a mesma solução padrão em três dias diferentes. A reprodutibilidade em relação ao tempo de retenção e à área dos picos foi determinada pelo cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação de 18 injecções dessa solução padrão.

v) Linearidade e curvas de calibração

A calibração do sistema cromatográfico foi efectuada pelo método do padrão externo. Foram preparadas soluções padrão de caseína inteira de vaca no intervalo de concentrações de 0,377 a 3,765 mg/ml. Antes de injectar uma nova solução foi efectuado um branco, de modo a assegurar que não havia interferências por parte da solução anterior. Cada solução foi analisada em triplicado.

Foram determinadas curvas de calibração para a caseína inteira de vaca e para as diferentes fracções de caseína. As curvas de calibração destas últimas foram obtidas tendo em conta a área dos respectivos picos e a concentração de cada fracção existente na solução injectada. A concentração de cada fracção de caseína existente nas soluções padrão de caseína inteira foi calculada com base na relação teórica descrita na literatura para o leite de vaca.

A linearidade do método foi verificada através das curvas de calibração, determinadas para cada fracção de caseína e obtidas por regressão linear da área dos picos *vs* concentração.

vi) Limites de detecção e de quantificação da técnica de HPLC

O limite de detecção é a quantidade mínima do composto a analisar, que é possível detectar e que apresenta uma resposta significativamente diferente da de um branco do ensaio (Miller, 1991; Huber, 1998). Foi avaliado como a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão do ruído de fundo, após efectuar seis injecções sucessivas de solvente (70% de solvente A + 30% solvente B).

O limite de quantificação foi determinado como sendo a concentração mínima do composto a analisar que pode ser medida, e que permite uma quantificação precisa. Deste modo, acima desse valor considerou-se que os resultados quantitativos obtidos apresentam um razoável grau de confiança. Este valor foi calculado, de acordo com Huber (1998), após sucessivas diluições da solução padrão até que a resposta do detector, para cada uma das fracções de caseína, não variasse mais do que 25%.

vii) Precisão do método

A precisão do método analítico foi avaliada tendo em conta a sua repetibilidade e reprodutibilidade.

O estudo da repetibilidade do método consistiu na análise, no mesmo dia, de seis alíquotas de caseína, obtidas, cada uma, a partir da precipitação de 15 ml de leite, da mesma amostra de leite de vaca. Cada alíquota foi analisada em triplicado. Efectuou-se o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação dos tempos de retenção e das áreas dos picos, de 16 injecções dessas amostras.

A reprodutibilidade do método foi estudada a partir de 12 alíquotas de caseína, obtidas da mesma amostra de leite de vaca, analisadas em triplicado e em dias diferentes. A reprodutibilidade em relação ao tempo de retenção e à área dos picos foi determinada pelo cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação de 34 injecções dessas amostras.

viii) Exactidão do método

As percentagens de recuperação foram determinadas recorrendo ao método das adições. Deste modo, foram adicionadas quantidades conhecidas de padrão de caseína inteira de vaca a três alíquotas de uma mesma amostra de leite de vaca (57; 113; 169 mg em 15 ml de leite de vaca). Após a adição e dissolução do padrão procedeu-se à

precipitação das caseínas como indicado anteriormente no ponto 2.1.2. Cada alíquota de caseína assim obtida, foi analisada em triplicado.

Analisou-se também, em triplicado, uma alíquota de caseína obtida a partir de 15 ml da mesma amostra de leite de vaca sem adição de padrão, sendo esta amostra considerada como branco.

A percentagem de recuperação foi determinada comparando o teor em caseínas encontrado nos ensaios com e sem adição de padrão.

2.2.4. Quantificação das caseínas de leite de vaca

As diferentes fracções de caseína em amostras de leite cru, leite UHT meio gordo, leite em pó e leite do dia meio gordo, foram quantificadas utilizando as respectivas equações das curvas de calibração.

2.2.5. Análise das caseínas de leite de ovelha, de cabra e de queijos

Utilizando as condições descritas em 2.2.3., efectuou-se a análise das caseínas de leite cru de cabra e de ovelha, de misturas contendo 1, 2, 5, 10 e 20% de leite de vaca em leite de ovelha e em leite de cabra, assim como, de caseínas de diferentes queijos. Para estas amostras procedeu-se a uma análise qualitativa, baseada na comparação dos respectivos cromatogramas com os obtidos para as amostras de caseína de leite de vaca.

Como só foi possível encontrar comercializado padrão da caseína inteira de ovelha e não das diferentes fracções desta caseína, não foi possível realizar um estudo tão completo como o que se descreveu para o leite de vaca. Deste modo, determinou-se uma curva de calibração com soluções padrão de caseína inteira de ovelha na gama de concentrações de 0,430 a 4,305 mg/ml.

Procedeu-se ainda, à análise estatística da influência da maturação, da adulteração e da interacção destes dois factores, por análise de variância (ANOVA), recorrendo ao algoritmo GLM (*General Linear Model*), do programa SAS, versão 8.0 (*Statistical*

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Analysis Systems Institute, 1999). Consideraram-se significativas as diferenças para $p<0,05$. As diferenças entre as médias individuais foram testadas usando o método de *Tukey*.

2.3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA

2.3.1. Padrões e reagentes

Os padrões de caseína utilizados na técnica de electroforese foram os mesmos já mencionados em 2.2.1. Utilizou-se ainda padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) fornecida pela Sigma Chemicals Co., com uma pureza mínima de 98%.

Os reagentes utilizados na preparação das soluções foram os seguintes: a acrilamida, a ureia, a N,N'-metilenodiacrilamida (bisacrilamida), o azul de bromofenol, o TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina), o glutaraldeído e o azul de Coomassie R250 foram adquiridos à Sigma Chemicals Co. O β-mercaptoetanol, o persulfato de amónio, o ácido clorídrico, o metanol, o ácido acético, o etanol, o ácido orto-fosfórico 85%, o formaldeído 25%, o carbonato de sódio, o EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético), o nitrato de prata e a acetona foram adquiridos à Merck. O tris(hidroximetilaminometano) foi adquirido à Calbiochem, a glicina (ácido aminoacético) à Promega e o azul de Coomassie G250 à Fluka. Todos os reagentes utilizados apresentavam uma pureza própria para ensaios de electroforese, não tendo sido sujeitos a qualquer purificação adicional.

2.3.2. Equipamento

A electroforese foi efectuada em tinas verticais modelo SE 280 da Hoefer Scientific Instruments, com uma fonte de voltagem Unipack 2000, marca UniQuip.

Na preparação das amostras utilizou-se um potenciómetro para medição do pH, modelo Metrohm 632 da Herisan e um eléctrodo de vidro combinado modelo 7172.

Utilizou-se ainda um espectrofotómetro de UV/Vis modelo Heλios α da Unicam, uma balança analítica Sartorius Basic, uma centrífuga Sigma 3K10 e um homogeneizador Potter Heidolph RZ R1.

2.3.3. Optimização do método de separação das caseínas

i) Preparação das amostras

Os padrões e as amostras de caseína precipitada de leite de vaca, ovelha e cabra, foram preparados dissolvendo as caseínas numa solução diluída de NaOH a pH 9. Após dissolução ajustou-se novamente o pH, que entretanto ficou mais ácido e pretendia-se que ficasse a pH 9. De seguida, foram agitados vigorosamente e colocados num banho de ultra--sons até dissolução total.

De modo a remover a gordura ainda existente e partículas em suspensão, procedeu-se a uma centrifugação a 3000 g e a 4 °C, durante 10 minutos. Determinou-se a concentração de proteína total de cada solução, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976).

Finalmente, as soluções foram colocadas em alíquotas de 2 ml e armazenadas a –20 °C até serem analisadas.

ii) Condições electroforéticas

A electroforese realizou-se de acordo com o método proposto por Andrews (1983), embora se tenham introduzido algumas modificações, nomeadamente no que se refere à composição dos tampões e constituição dos géis.

Os géis (1,5 mm de espessura, 12×16 cm) eram constituídos por um gel de concentração a 4% e um gel de corrida a 10% de poliacrilamida. O tampão do gel de concentração foi uma solução de Tris 0,06 M, ureia 4,5 M, pH 7,6, enquanto que o tampão do gel de corrida foi uma solução de Tris 0,76 M, ureia 9 M, pH 8,9. As amostras foram misturadas na proporção de 1:2 (v/v) com o tampão de amostra (Tris 0,12 M, ureia 8,2 M, EDTA 2,5 mM, β-mercaptoetanol 0,2 M, 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8) de modo a conterem 20 ou 1 μg de proteína total (entre 10 e 20 μl) para os géis corados com azul de Coomassie R250 ou nitrato de prata, respectivamente. Para o tampão dos eléctrodos foi

utilizada uma solução de Tris 0,02 M, glicina 0,19 M (Apêndice A). A electroforese desenvolveu-se inicialmente a 20 mA até atingir o gel de corrida e posteriormente a 30 mA, durante cerca de 2 horas e 30 minutos, a 4 °C.

A fixação e coloração dos géis foi realizada usando duas técnicas distintas: azul de Coomassie R250 e nitrato de prata. No primeiro caso, o processo consistiu na adição de uma solução de azul de Coomassie R250 a 1% (p/v) dissolvida numa solução de metanol, ácido acético, água (30:10:60 v/v) durante 15 minutos. O excesso de corante foi removido com uma solução de metanol, ácido acético, água (30:10:60 v/v). Para o nitrato de prata foi utilizado o método descrito por Morrissey (1981), que consiste numa primeira fase à adição de uma solução de metanol, ácido acético, água (50:10:40 v/v) durante 20 minutos; remoção e adição de uma outra solução de metanol, ácido acético, água (5:7:88 v/v) durante 20 minutos; remoção e adição de uma solução de glutaraldeído a 10%, durante 20 minutos. De seguida, o gel foi lavado várias vezes com água destilada, deixando-se ficar em água destilada durante pelo menos 2 horas. Posteriormente, procedeu-se à coloração do gel. A este, adicionou-se uma solução aquosa de 5 μg/ml de DTT (ditiotreitol), durante 20 minutos, a qual foi removida e de seguida foi adicionada uma solução 0,1% de nitrato de prata, durante 20 minutos. A revelação foi conseguida lavando rapidamente o gel com água destilada e depois com uma solução de 3% de carbonato de sódio e 0,05% de formaldeído. A revelação foi parada após adição de uma solução de ácido cítrico 0,3 M.

2.3.4. Análise das caseína dos queijos

Efectuaram-se igualmente ensaios electroforéticos para analisar as caseínas precipitadas de queijos manufacturados de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho e de queijos comerciais. As amostras de caseínas analisadas foram preparadas de acordo com o procedimento experimental anteriormente descrito no ponto 2.3.3. Com estes ensaios pretendeu-se avaliar a degradação das caseínas, devido à sua proteólise, ao longo da maturação, assim como, pesquisar adulterações nestes produtos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PRECIPITAÇÃO DAS CASEÍNAS

3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM FASE REVERSA

3.3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA

3.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICA E ELECTROFORÉTICA

No decorrer do trabalho experimental pretendeu-se optimizar duas técnicas analíticas, uma de HPLC e outra de electroforese, com vista à sua aplicação no controlo de qualidade de produtos lácteos, nomeadamente de queijos.

O desenvolvimento destas técnicas visou a sua utilização na separação das diferentes fracções de caseína do leite de vaca, ovelha e cabra, de modo a permitir uma análise quantitativa e/ou qualitativa dos produtos lácteos estudados.

Procedeu-se ainda à comparação dos desempenhos das referidas técnicas com o objectivo de estabelecer as potenciais vantagens e desvantagens de cada uma.

3.1. PRECIPITAÇÃO DAS CASEÍNAS

No que respeita à precipitação das caseínas foi avaliada a influência de diferentes factores: i) temperatura do leite antes da desnatação; ii) influência do pH; e iii) tempo/temperatura de centrifugação.

A diminuição da temperatura promovia uma maior libertação de gordura do leite. No entanto, de acordo com a literatura, uma temperatura de refrigeração demasiado baixa conduz a alterações nas micelas de caseína e nalguns casos à desnaturação irreversível da β-lactoglobulina podendo provocar a sua precipitação conjuntamente com as caseínas (Morr, 1985; Dalgleish, 1992; Cayot e Lorient, 1997). Deste modo, fixou-se em 8 °C a temperatura à qual se colocava o leite antes da desnatação.

Atendendo a que o ponto isoeléctrico das caseínas se encontra entre 3,9 e 5,2 (Mulvihill e Fox, 1989), foram testados dois valores possíveis: 4,3 e 4,6. Embora o último seja o mais utilizado na precipitação das caseínas do leite de vaca (van Hekken e Thompson, 1992; Visser *et al.*, 1995; Trujillo *et al.*, 2000a, 2000b), optou-se pelo primeiro uma vez que, se verificou que para os leites de cabra e ovelha a precipitação ocorria a um pH próximo de 4,3. Este mesmo valor foi o utilizado por Mayer e Hörtner (1995). Sannier *et al.* (2000) indicam que o ponto isoeléctrico das caseínas de leite de cabra é de 4,2.

Na etapa de centrifugação foram utilizadas duas temperaturas: 4 e 20 °C. A primeira foi a escolhida na fase da desnatação, pelas razões anteriormente apontadas. Quanto à temperatura de 20 °C foi utilizada em virtude de ser a descrita na literatura para a

precipitação das caseínas. O tempo e número de centrifugações foram estabelecidos de modo a permitir uma remoção eficaz das proteínas do soro e de restos de gordura que não tinham sido removidos durante a desnatação.

3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM FASE REVERSA

Como já foi referido, a cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa é um método de grande aplicação na separação de proteínas e péptidos e tem sido aplicada no estudo das caseínas (Mora-Gutierrez *et al.*, 1991; Strange *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1991, 1995; Bobe *et al.*, 1998).

3.2.1. Optimização e validação do método para a separação, identificação e quantificação das caseínas de leite de vaca

Numa primeira etapa procedeu-se à optimização de algumas condições, nomeadamente no que se refere ao solvente utilizado na preparação das amostras e condições cromatográficas (gradiente, temperatura e fluxo).

No que se refere ao solvente utilizado na preparação das amostras testaram-se as seguintes soluções:

- solução com 50% de solvente A e 50% de solvente B;
- solução com 70% de solvente A e 30% de solvente B;
- solução 4,5 M de ureia em 50% de solvente A e 50% de solvente B;
- solução 4,5 M de ureia em 70% de solvente A e 30% de solvente B;
- solução 10 mM de β-mercaptoetanol e 4,5 M de ureia em 50% de solvente A e 50% de solvente B;
- solução 10 mM de β-mercaptoetanol e 4,5 M de ureia em 70% de solvente A e 30% de solvente B.

As soluções preparadas usando ureia e/ou β-mercaptoetanol foram testadas em virtude de serem utilizadas frequentemente em estudos semelhantes (Andrews *et al.*, 1985; Chaplin, 1986; Hollar *et al.*, 1991; Strange *et al.*, 1991). No entanto, os perfis cromatográficos obtidos não foram muito diferentes dos conseguidos com as soluções sem estes compostos. Atendendo à maior complexidade na preparação das soluções com ureia e/ou β-mercaptoetanol e à toxicidade deste último, escolheu-se a solução com 70% de solvente A e 30% de solvente B, uma vez que, conduzia a uma linha de base mais estável no início da corrida, apesar da semelhança dos cromatogramas obtidos com as outras soluções.

Quanto às condições cromatográficas, avaliou-se a influência de diferentes gradientes, temperatura da coluna e fluxo, tendo-se utilizado um eluente constituído por 0,1% de TFA em água (v/v) (solvente A) e 95% de acetonitrilo, 5% de água e 0,1% TFA (v/v) (solvente B). Numa primeira fase, procedeu-se à optimização do gradiente à temperatura ambiente (25 ± 5 ºC). Diferentes gradientes foram testados (variando quer a composição inicial e final, quer o tempo de cada patamar), tendo-se escolhido o indicado no ponto 2.2.3., uma vez que permitiu uma maior resolução das fracções de caseína. Com o intuito de conseguir uma melhor separação efectuou-se a eluição a diferentes temperaturas: 30, 40, 46 e 55 ºC. Verificou-se que a separação era favorecida pelas temperaturas mais elevadas, tendo-se escolhido a temperatura de 46 ºC. Temperaturas acima de 55 ºC foram rejeitadas de modo a evitar a agregação das caseínas no interior da coluna. Mais ainda, constatou-se que a 55 ºC, os tempos de retenção das fracções de caseína aumentavam significativamente (cerca de 5 minutos). Outros autores realizaram estudos similares tendo seleccionado temperaturas de operação de 40 ºC (Carles e Ribadeau-Dumas, 1986; Christensen *et al.*, 1989; Pavia *et al.*, 2000; Trujillo *et al.*, 2000a) e de 46 ºC (Trujillo *et al.*, 2000a). Por fim, a influência do fluxo na separação foi avaliada tendo-se testado três valores: 0,8; 1,0 e 1,2 ml/min. De entre estes, verificou-se que o caudal de 1,0 ml/min foi o que permitiu um binómio separação/tempo de retenção mais favorável.

Posteriormente, procedeu-se à validação do método que incluiu as etapas de precipitação da caseína, preparação das amostras e sua análise por HPLC (Apêndice B).

i) Identificação das fracções de caseína

A identificação da α, β e κ-caseínas baseou-se: na comparação dos tempos de retenção obtidos para as soluções padrão de cada fracção e os picos obtidos para a caseína precipitada a partir de amostras de leite de vaca; no estudo da relação teórica das fracções de caseína e, no método da adição de padrão.

Tempos de retenção

As diferentes fracções de caseína foram identificadas por comparação dos tempos de retenção obtidos nos perfis cromatográficos das soluções padrão da κ, α ou β-caseínas com os obtidos para soluções de caseína bovina precipitada. Os resultados podem ser observados na Tabela 3.1. e na Figura 3.1.

Tabela 3.1. – Tempos de retenção das diferentes fracções de caseína do leite de vaca: comparação entre padrões e amostras.

Fracção de caseína	**Tempo de retenção (min)**		**Desvio relativo[i] (%)**
	valor médio de 3 injecções de padrão (A)	valor médio de 34 injecções de caseína inteira de vaca (B)	
κ-caseína	14,86	14,85	-0,07
α-caseína	18,36	18,58	1,20
β-caseína	22,23	21,64	2,65

i: Desvio relativo (%)= [(B-A)/A]×100

Os perfis esboçados na Figura 3.1. bem como a concordância obtida nos tempos de retenção, e expressa pelos baixos valores dos desvios relativos calculados, permitem identificar os picos como sendo: κ, α e β-caseína. É de referir que, o perfil cromatográfico obtido para a β-caseína apresenta um pico significativo na região da κ-caseína, devido à contaminação desse padrão.

Convém ainda salientar que no perfil obtido após a injecção de 20 μl de solvente (perfil vi, Figura 3.1.), regista-se um aumento da linha de base para um tempo de eluição da ordem dos 31 minutos. Este facto ocorreu em todas as análises realizadas e pode ser atribuído à eluição de pequenas quantidades de TFA, adsorvidas pela matriz aquando da passagem do solvente polar, e eluídas durante o aumento da percentagem da fase orgânica

na fase móvel. Idêntico comportamento foi constatado por Elgar *et al.* (2000) no estudo das proteínas do soro de leite de vaca por HPLC em fase reversa com uma coluna de poliestireno divinilbenzeno, semelhante à usada neste estudo.

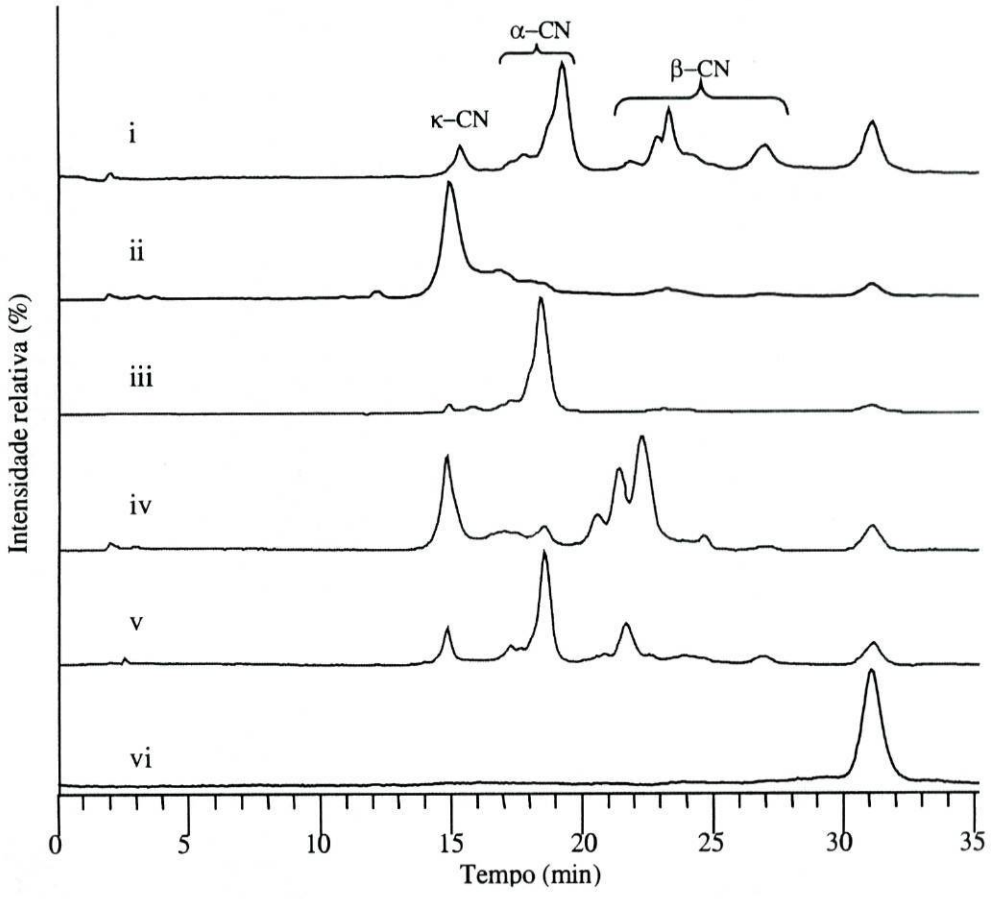


Figura 3.1. – Perfis cromatográficos das caseínas de leite de vaca, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: (i) padrão da caseína total; (ii) padrão da κ-caseína; (iii) padrão da α-caseína; (iv) padrão da β-caseína; (v) caseína inteira de leite de vaca; (vi) linha de base.

Relação teórica das fracções de caseína no leite de vaca

A identificação dos picos relativos a cada uma das três fracções de caseína bovina (κ, α, β-caseína) foi igualmente realizada por comparação com a percentagem teórica de cada uma delas descrita na literatura: 10:50:40 (Visser *et al.*, 1991; Jong *et al.*, 1993; Haza *et al.*, 1996; Bobe *et al.*, 1998).

Com base nos resultados obtidos após 36 injecções de soluções padrão de caseína total, de concentrações entre 0,377 e 3,765 mg/ml, obtiveram-se as seguintes relações para

as áreas dos picos encontrados *vs* área total dos mesmos: 8,43% para o primeiro pico (CV= 5,14%); 50,81% para o segundo pico (CV= 3,18%); e, 40,76% para a soma do terceiro e quarto picos (CV= 4,40%). Observando a Figura 3.1., verifica-se que o terceiro e quarto picos referem-se à β-caseína, verificando-se igualmente, que só a área do conjunto destes dois picos corresponde à percentagem teórica esperada para esta fracção de caseína. Resultados idênticos foram obtidos após 34 injecções de soluções de caseína precipitada de leite de vaca: 11,69% para o primeiro pico (CV= 3,45%); 51,16% para o segundo pico (CV= 1,77%); e, 37,15% para os terceiro e quarto picos (CV= 2,63%). Assim, o facto das relações entre as áreas dos vários picos obtidos estarem de acordo com as relações descritas na literatura reforça a identificação proposta com base nos perfis esboçados na Figura 3.1., bem como, a concordância obtida nos tempos de retenção.

Método da adição de padrão de cada fracção de caseína

Procedeu-se ainda à identificação dos picos recorrendo ao método da adição de padrão. Este método permite avaliar o aumento da área de cada pico provocado pela adição de uma solução padrão de κ, α, ou β-caseína, separadamente.

Assim sendo, a 1,5 ml de uma solução de caseína precipitada de leite da vaca, de concentração aproximada de 1 mg/ml, adicionaram-se 100 µl de uma solução de padrão de κ, α, ou β-caseína, de concentração 2 mg/ml. Os resultados obtidos encontram-se expressos na Tabela 3.2.

Da tabela pode inferir-se que quanto à κ e α-caseína a identificação dos picos por este método é inequívoca, verificando-se que em ambos os casos, apenas o pico relativo a cada uma dessas fracções aumenta e de um modo significativo, enquanto que os outros diminuem. Nos ensaios relativos à identificação do pico da β-caseína, apesar de se verificar um aumento percentual superior para o pico da κ-caseína, constata-se que, em termos de área, o pico que mais aumentou foi o da β-caseína. O que está concordante com o cromatograma obtido para o padrão da β-caseína (perfil iv, Figura 3.1.), que apresenta um pico bastante significativo para a κ-caseína.

O conjunto dos resultados obtidos nas experiências anteriores permite a identificação dos picos referentes a cada fracção de caseína bovina.

Tabela 3.2. – Identificação dos picos das diferentes fracções de caseína de leite vaca pelo método da adição.

Fracção de caseína	**Área de cada pico**		
	Sem adição	***Com adição κ-caseína***	***Variação (%)***
κ-caseína	322842	421136	30,45
α-caseína	1452869	1304383	-10,22
β-caseína	863832	791289	-8,40
	Sem adição	***Com adição α-caseína***	***Variação (%)***
κ-caseína	322842	305263	-5,45
α-caseína	1452869	1816798	25,05
β-caseína	863832	784639	-9,17
	Sem adição[i]	***Com adição β-caseína***	***Variação (%)***
κ-caseína	240079	308132	28,35
α-caseína	1312294	1346632	2,62
β-caseína	800178	914228	14,25

i: os valores indicados referem-se a uma nova solução de caseína precipitada da mesma amostra de leite de vaca.

ii) Repetibilidade e reprodutibilidade da técnica de HPLC

A repetibilidade e a reprodutibilidade da técnica foram estudadas com base na comparação dos resultados obtidos, em termos de áreas e de tempos de retenção, após seis injecções (no mesmo dia) e dezoito injecções (em três dias diferentes) de soluções padrão da caseína total, respectivamente.

A qualidade dos resultados foi avaliada com base no cálculo dos coeficientes de variação (Tabela 3.3.). Os resultados obtidos indicam que a técnica utilizada apresenta uma repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórias, o que pode ser confirmado pelos baixos valores dos coeficientes de variação calculados.

É de realçar que, a coluna já tinha sido anteriormente utilizada, tendo sido sujeita a um longo período de armazenamento (cerca de 2 anos). Com efeito, neste trabalho foi necessário proceder à sua regeneração. Assim sendo, seria de esperar uma diminuição das variações observadas, especialmente em termos de áreas, se a coluna fosse nova.

Tabela 3.3. - Repetibilidade e reprodutibilidade do HPLC, expressa como coeficiente de variação (CV), determinada a partir de uma solução padrão de caseína bovina de concentração 1,5 mg/ml.

Ensaios	n[i]	κ-caseína		α-caseína		β-caseína		Caseína total
		TR CV (%)	Área CV (%)	TR CV (%)	Área CV (%)	TR CV (%)	Área CV (%)	Área CV (%)
No mesmo dia	6	0,94	3,00	0,63	2,38	0,39	3,22	1,92
Em dias diferentes[ii]	18	0,85	6,70	1,09	3,81	1,09	7,60	5,22

i: número de injecções consecutivas.
ii: três dias diferentes

iii) Linearidade e curvas de calibração

Nas condições experimentais descritas, verifica-se uma relação linear entre as áreas dos picos referentes a cada fracção de caseína e a concentração. Idêntico comportamento é observado para a caseína total.

Os parâmetros das curvas de calibração apresentam-se na Tabela 3.4. Os coeficientes de variação, em termos de áreas, obtidos para cada nível de concentração, calculados com base nos resultados de três análises consecutivas, estão compreendidos entre: 1,43 e 3,39% para a α-caseína; 0,51 e 4,34% para a β-caseína; 1,76 e 6,62% para a κ-caseína e 0,78 e 2,64% para a caseína total.

Tabela 3.4. – Parâmetros das curvas de calibração determinados pelo método do padrão externo.

Caseína	Intervalo de concentrações (mg/ml)	n[i]	Declive[ii] (ml/mg)	Ordenada na origem[ii]	r[iii]
Caseína total	0,377 – 3,765	6	3424112 (± 71192)	716828 (± 140985)	0,9998
κ-caseína	0,038 – 0,377	6	2774333 (± 148174)	67319 (± 29345)	0,9988
α-caseína	0,188 – 1,883	6	3508475 (± 77829)	321096 (± 77063)	0,9998
β-caseína	0,151 – 1,506	6	3481104 (± 181150)	328412 (± 143496)	0,9988

i: Número de pontos considerados na regressão linear. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em três injecções consecutivas de cada solução padrão.
ii: O erro padrão do declive e da ordenada na origem da regressão é dado entre parêntesis.
iii: Coeficiente de correlação.

A Figura 3.2. reforça a conclusão já apresentada no que se refere à linearidade das curvas de calibração.

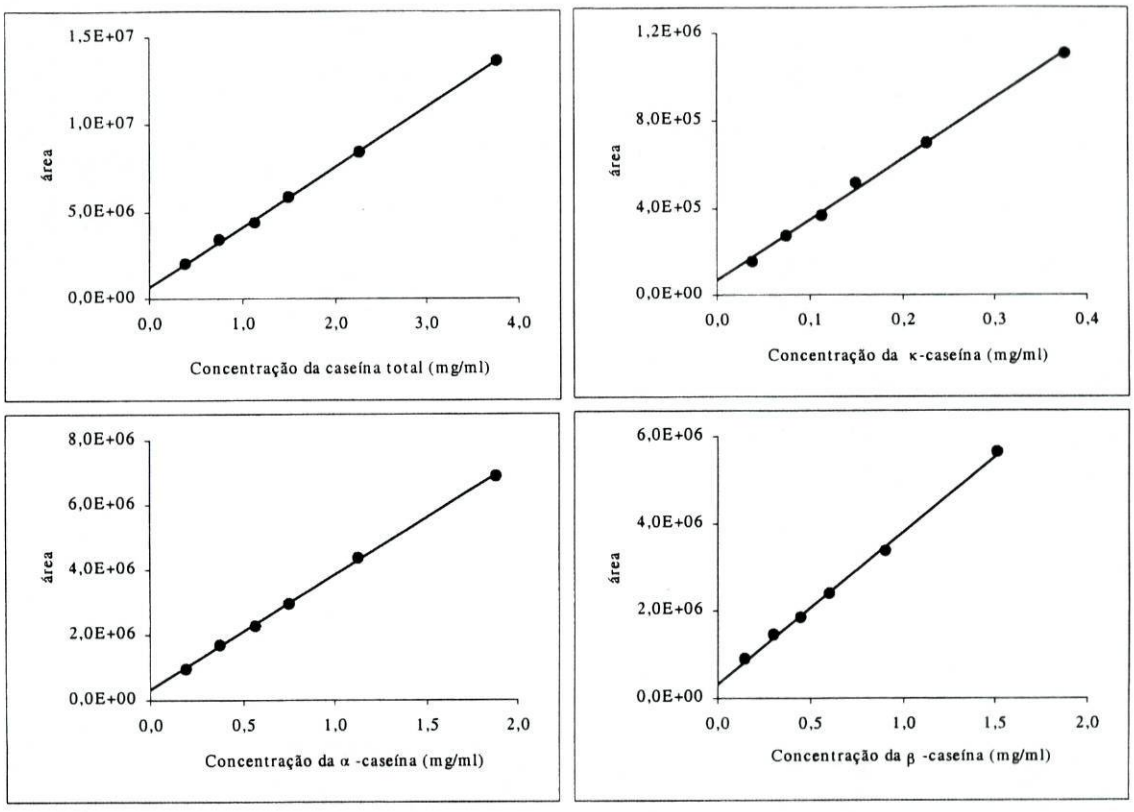


Figura 3.2. – Curvas de calibração obtidas para a caseína total, κ, α e β-caseínas bovinas.

iv) Limites de detecção e de quantificação da técnica de HPLC

O limite de detecção da técnica foi de 0,0188 mg/ml para a α-caseína e de 0,0150 mg/ml para a β-caseína (obtidos a partir da injecção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,0375 mg/ml) e 0,0060 mg/ml para a κ-caseína (determinado a partir da injecção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,0600 mg/ml).

O limite de quantificação foi de 0,0375 mg/ml para a α-caseína, de 0,0300 mg/ml para a β-caseína e de 0,0075 mg/ml para a κ-caseína (determinado a partir da injecção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,0750 mg/ml).

v) Precisão do método

A precisão do método foi avaliada tendo em conta a sua repetibilidade e reprodutibilidade, englobando as etapas de precipitação das caseínas, preparação das amostras e análise cromatográfica de amostras de caseínas de origem bovina.

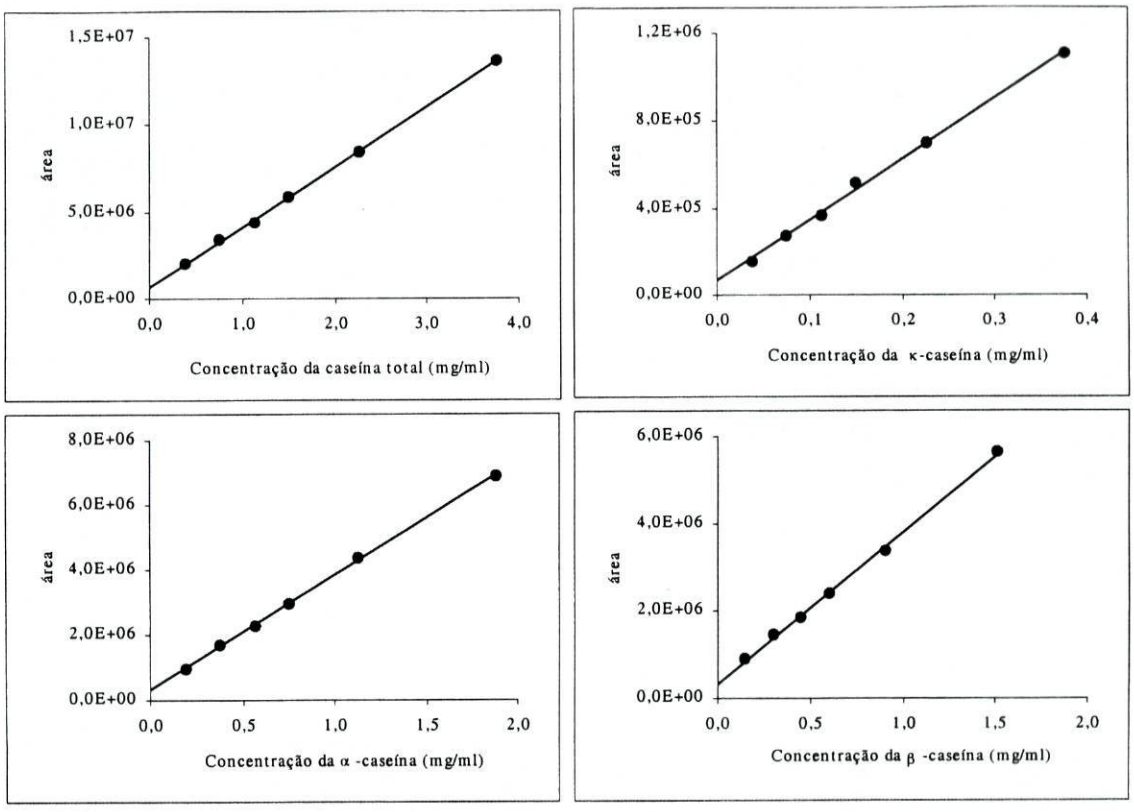


Figura 3.2. – Curvas de calibração obtidas para a caseína total, κ, α e β-caseínas bovinas.

iv) Limites de detecção e de quantificação da técnica de HPLC

O limite de detecção da técnica foi de 0,0188 mg/ml para a α-caseína e de 0,0150 mg/ml para a β-caseína (obtidos a partir da injecção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,0375 mg/ml) e 0,0060 mg/ml para a κ-caseína (determinado a partir da injecção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,0600 mg/ml).

O limite de quantificação foi de 0,0375 mg/ml para a α-caseína, de 0,0300 mg/ml para a β-caseína e de 0,0075 mg/ml para a κ-caseína (determinado a partir da injecção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,0750 mg/ml).

v) Precisão do método

A precisão do método foi avaliada tendo em conta a sua repetibilidade e reprodutibilidade, englobando as etapas de precipitação das caseínas, preparação das amostras e análise cromatográfica de amostras de caseínas de origem bovina.

Tabela 3.6. – Ensaios de recuperação do método numa amostra de leite de vaca.

Caseínas	Teor inicial		Adição	Teor encontrado		Recuperação
	(mg/15 ml)	CV (%)	(mg/15 ml)	(mg/15 ml)	CV (%)	(%)
Caseína total	245,81	0,97	57,0	294,49	2,17	97
κ-caseína	40,64	0,52	5,7	45,28	1,69	98
α-caseína	129,67	1,24	28,5	150,53	2,25	95
β-caseína	78,71	3,82	22,8	101,88	2,45	100
Caseína total	245,81	0,97	113,0	333,01	1,83	93
κ-caseína	40,64	0,52	11,3	50,15	0,97	97
α-caseína	129,67	1,24	56,5	168,67	3,22	91
β-caseína	78,71	3,82	45,2	117,59	1,67	95
Caseína total	245,81	0,97	169,0	395,55	1,19	95
κ-caseína	40,64	0,52	16,9	55,12	2,27	96
α-caseína	129,67	1,24	84,5	204,59	1,90	96
β-caseína	78,71	3,82	67,6	138,94	1,28	95

3.2.2. Quantificação das caseínas de leite de vaca

As curvas de calibração obtidas anteriormente para a caseína inteira de vaca e para as suas fracções foram utilizadas para quantificar a caseína bovina precipitada a partir de amostras de diferentes leites de vaca: cru, UHT meio gordo, em pó e do dia meio gordo. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. - Quantificação da caseína inteira de vaca e das respectivas fracções, precipitada a partir de diferentes amostras de 15 ml de leite cru, do dia meio gordo, UHT meio gordo e em pó.

Caseína	Massa de caseína (mg) em 15 ml de leite de vaca			
	leite cru	leite do dia meio gordo	leite UHT meio gordo	leite em pó
κ-caseína	40,54 (± 0,17)	36,08 (± 0,54)	14,44 (± 1,00)	21,12 (± 0,01)
α-caseína	129,70 (± 2,27)	115,68 (± 2,06)	103,27 (± 0,87)	102,75 (± 1,72)
β-caseína	80,12 (± 2,48)	83,30 (± 2,47)	86,70 (± 7,60)	80,81 (± 1,11)
Caseína inteira	247,19 (± 0,07)	232,45 (± 5,06)	205,66 (± 7,64)	204,54 (± 2,89)

Valores expressos como a média (desvio padrão) de 2 determinações.

A análise da Tabela 3.7. permite concluir que o teor de caseína não apresenta grandes oscilações para os diferentes leites estudados, o que era de esperar atendendo à origem comum dos referidos leites. No entanto, de acordo com a literatura o leite de vaca contém em média 30 a 42,5 g/l de proteína total, das quais 80% são referentes à caseína, o que corresponde a 360 a 510 mg de caseína em 15 ml de leite (Swaisgood, 1992; Wong *et al.*, 1996; Dalgleish, 1997). Comparando com os resultados obtidos neste estudo, verifica-se que os valores obtidos são inferiores. Esta diferença poderá ser parcialmente explicada tendo em conta que a composição proteica do leite varia com a espécie animal, a estação do ano e alimentação (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1982; McLean *et al.*, 1984 e Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987, citados por Bobe *et al.*, 1998). De facto, Bobe *et al.* (1998) constataram que a percentagem mássica de cada fracção de caseína bovina, obtidas a partir de diferentes amostras de leite provenientes de 234 vacas variavam significativamente (CV: 13,09%, 6,09%, 22,50% e 8,13% para a κ, α_{s1}, α_{s2} e β-caseína, respectivamente). Anteriormente, Strange *et al.* (1991) tinham também verificado que o teor das diferentes fracções de caseína bovina obtidas a partir do leite de sete vacas variavam consideravelmente: entre 7,8 e 20,1% para a κ e α_{s2}-caseína; entre 35,1 e 46,2% para a β-caseína e entre 35,5 e 49,2% para a α_{s1}-caseína. Contudo a composição em caseína determinada pelo método desenvolvido neste trabalho, é similar aos valores obtidos experimentalmente por outros autores (Walstra e Jenness, 1984; Bobe *et al.*, 1998) como se pode constatar da Tabela 3.8.

Tabela 3.8. – Teor de caseína em leite de vaca: comparação entre os valores experimentais obtidos neste estudo e os obtidos por Walstra e Jenness (1984) e por Bobe *et al.* (1998).

Caseína	**Composição em caseína** (p %)[i]					
	Este trabalho				Literatura	
	leite cru[ii]	leite do dia meio gordo[ii]	leite UHT meio gordo[ii]	leite em pó[ii]	leite cru (Walstra e Jenness,1984)	leite cru (Bobe *et al.*, 1998)
κ-caseína	16,40 (± 0,07)	15,53 (± 0,11)	7,02 (± 0,22)	10,33 (± 0,15)	12,69	19,72
α-caseína	52,47 (± 0,93)	49,77 (± 0,20)	50,26 (± 2,29)	50,23 (± 0,01)	48,64	46,91
β-caseína	32,41 (± 0,99)	35,83 (± 0,28)	42,12 (± 2,13)	39,51 (± 0,58)	38,67	33,37

i: p % é a percentagem mássica de cada fracção de caseína no teor de caseína total.
ii: valores expressos como a média (desvio padrão) de 2 determinações.

Verifica-se ainda, uma concordância entre os tempos de retenção obtidos para as diferentes fracções de caseína para os leites estudados (CV: 0,57%, 2,80% e 4,14% para a

κ, α e β-caseína, respectivamente). A diferença entre os tempos de retenção pode ser explicada devido a pequenas variações diárias da composição dos eluentes, uma vez que estes eram preparados diariamente.

Os resultados expressos nas Tabelas 3.7. e 3.8. permitem ainda agrupar os leites estudados: leite cru e leite do dia, leite UHT e leite em pó. De facto, para o leite UHT e em pó, o pico referente à fracção de κ-caseína é inferior quando comparado com o obtido para o leite cru ou o leite do dia. Este facto poderá ser justificado atendendo à semelhança entre tratamentos térmicos a que cada grupo esteve sujeito. Esta conclusão é reforçada pela observação dos perfis cromatográficos apresentados na Figura 3.3.

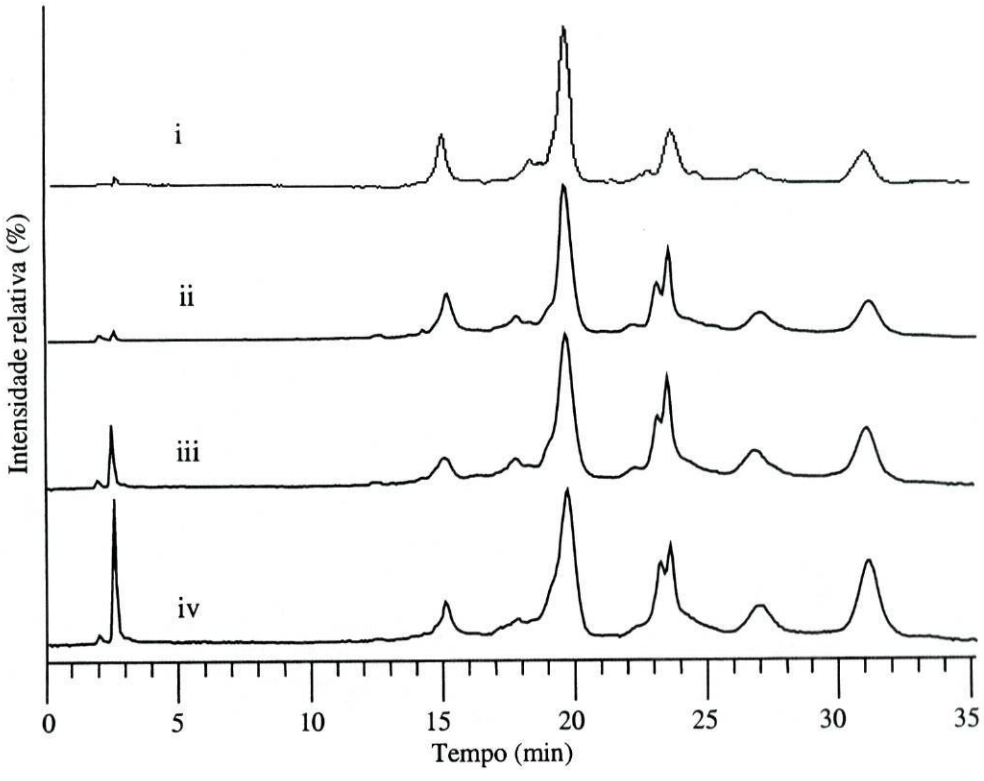


Figura 3.3. – Perfis cromatográficos da caseína inteira de leite de vaca, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: (i) leite cru; (ii) leite do dia meio gordo; (iii) leite UHT meio gordo; (iv) leite em pó.

A observação da Figura 3.3. permite verificar para além da diminuição do pico referente à κ-caseína no leite UHT e leite em pó, o aparecimento de um pico entre os 2 e os 3 minutos. Este fenómeno poderá ser explicado pela formação do complexo entre a β-lg e a κ-caseína, resultado do tratamento térmico. Sabe-se que o aquecimento do leite diminui a

estabilidade da β-lg provocando a sua desnaturação, e o consequente estabelecimento de interacções hidrofóbicas e ligações dissulfureto com a κ-caseína, o que diminui a sua solubilidade a pH 4,6, precipitando assim juntamente com as caseínas (Morr, 1985; Nielsen e Waagner, 1988; Funtenberger *et al.*, 1997). Este complexo poderá ser o responsável pelo aparecimento do pico referido. Este facto está de acordo com os resultados obtidos por Douglas Jr. *et al.* (1981) e Parris *et al.* (1990), que constataram igualmente, por electroforese e/ou RP-HPLC, uma diminuição do teor de κ-caseína e o aparecimento de um complexo β-lg/κ-caseína em leites UHT comparativamente ao leite cru.

3.2.3. Análise das caseínas de leite de ovelha, de cabra e de queijos

O método cromatográfico desenvolvido neste trabalho foi igualmente aplicado a caseínas de origem caprina e ovina, precipitadas a partir de leites crus e queijos. O método foi igualmente aplicado no estudo de adulterações em produtos lácteos, bem como no estudo da proteólise de queijos. Com este objectivo, avaliou-se se as condições estabelecidas anteriormente para as caseínas bovinas permitiam a obtenção de diferentes perfis cromatográficos consoante a origem das caseínas e o tempo de maturação dos queijos.

i) Comparação entre os perfis cromatográficos das caseínas de origem bovina, ovina e caprina

Na Figura 3.4. apresentam-se os perfis cromatográficos obtidos para as caseínas de vaca, ovelha e cabra, quando analisados individualmente e usando as condições cromatográficas anteriormente descritas. Embora, para as caseínas ovina e caprina não se tenha procedido à optimização das referidas condições, os picos obtidos apresentam uma boa resolução. Admitindo que a ordem de eluição das fracções de caseína ovina e caprina é a mesma da caseína bovina, poder-se-á, por analogia, identificar os picos *'1'*, *'2'* e *'3-4'* como a κ, α e β-caseína, respectivamente. Os perfis cromatográficos obtidos para a caseína ovina e caprina apresentam claramente dois picos para a β-caseína (β_1 e β_2), já descritos na

literatura (Kaminarides e Anifantakis, 1993; Kalantzopoulous, 1999; Trujillo *et al.*, 2000a). De acordo com Kalantzopoulous (1999), a β_1 e β_2-caseínas são compostas pelos mesmos aminoácidos, no entanto, a β_1-caseína contém um grupo fosfato adicional sendo mais sensível à presença de iões cálcio. Kaminarides e Anifantakis (1993), por HPLC de permuta aniónica, e Trujillo *et al.* (2000a, 2000b) e Mora-Guttierrez *et al.* (1991), por RP-HPLC, obtiveram perfis de eluição idênticos para as caseínas ovina e caprina, embora requerendo um maior tempo de análise (40 a 120 minutos) quando comparados com o utilizado neste estudo.

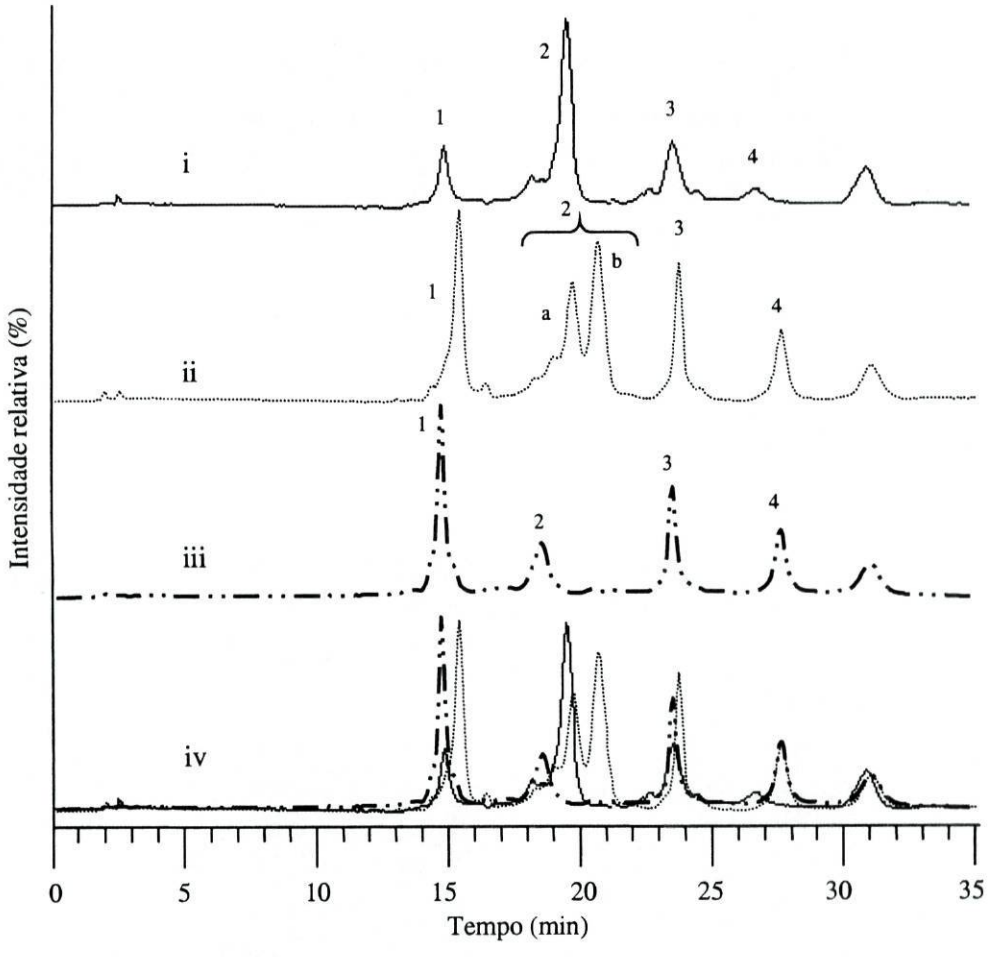


Figura 3.4. – Perfis cromatográficos da caseína inteira bovina, ovina e caprina, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: (i) leite de vaca cru; (ii) leite de ovelha cru; (iii) leite de cabra cru; (iv) comparação dos três leites. 1 - κ-caseína; 2 - α-caseína; 3 e 4 - β-caseína.

As relações obtidas entre a área de cada pico e a área total para as diferentes fracções das caseínas do leite de ovelha e de cabra foram: 24:50:26 para a κ, α e β-caseína ovina e

40:20:40 para a κ, α e β-caseína caprina. Estes valores, embora não coincidam com a abundância relativa esperada, são da mesma ordem de grandeza dos descritos na literatura: para o leite de ovelha entre (10 a 17):(30 a 47):(36 a 47) para a κ, α, β-caseína, respectivamente; e para o leite de cabra entre (15 a 29):(8 a 50):(43 a 75) para a κ, α, β-caseína (Haza *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996; Kalantzopoulos, 1999). A discrepância destes valores realça a importância e a necessidade de um maior estudo das fracções das caseínas destes dois tipos de leite.

Com base nos diferentes perfis individuais obtidos, e efectuando a sobreposição destes, era esperado ser possível uma fácil detecção da presença de leite de vaca em leite de ovelha ou em leite de cabra, tornando, deste modo, possível avaliar adulterações (perfil iv, Figura 3.4.). Kaminarides e Anifantakis (1993), usando HPLC de permuta aniónica, obtiveram também perfis diferentes para os leites mencionados.

Para se inferir, se na prática é fácil detectar adulterações de leite de ovelha e de cabra com leite de vaca, analisaram-se misturas de 1, 2, 5, 10 e 20% (v/v) de leite de vaca em leite de ovelha e em leite de cabra. Da análise da Figura 3.5. é possível concluir que no que se refere às adulterações vaca/ovelha os perfis obtidos não permitem identificá-las, pois a relação entre as áreas dos diferentes picos mantém-se aproximadamente constante para as diferentes percentagens de adulterações estudadas (CV entre 0,8 e 3,3%). Porém, na Figura 3.4. observa-se que o segundo pico (α-caseína) é diferente, uma vez que, a caseína bovina corresponde a um único pico enquanto que a ovina apresenta dois picos semi-sobrepostos (*a* e *b*). No entanto, o segundo pico da caseína de vaca elui a um tempo de retenção um pouco inferior ao da caseína de ovelha. Assim sendo, apenas este pico permitiria identificar a presença de leite de vaca no leite de ovelha. Contudo, o pico referente à α-caseína bovina poderá ser camuflado pelo pico *'2a'* da caseína ovina, impossibilitando deste modo a detecção das adulterações. Verifica-se que a área relativa - área de cada pico/área total do cromatograma - dos picos *'2a'* e *'2b'* varia com o aumento da percentagem de adulteração de leite de vaca no leite de ovelha (Figura 3.6.). Esta variação poderá ser associada, qualitativamente, à adulteração, uma vez que conduz a um aumento do pico *'2a'* onde poderá estar contido o pico referente à α-caseína bovina.

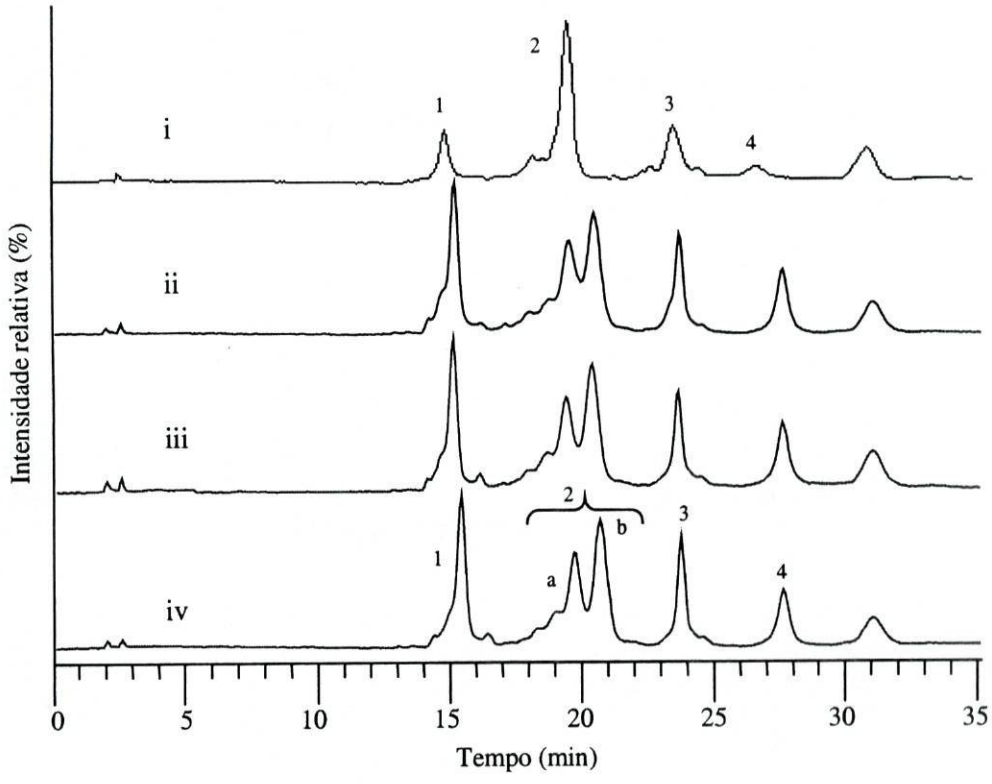


Figura 3.5. – Perfis cromatográficos da caseína inteira bovina e ovina, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: (i) leite de vaca cru; (ii) adulteração de 20% de leite de vaca em leite de ovelha; (iii) adulteração de 5% de leite de vaca em leite de ovelha; (iv) leite de ovelha cru. 1 - κ-caseína; 2 - α-caseína; 3 e 4 - β-caseína.

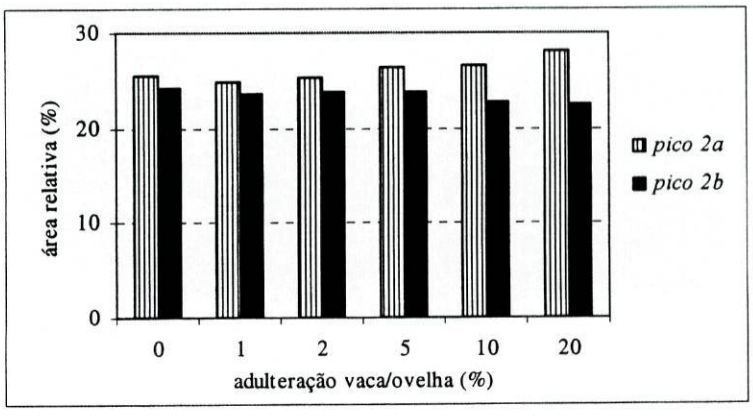


Figura 3.6. – Variação da área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'* com a percentagem de leite de vaca em leite de ovelha.

No que se refere às adulterações vaca/cabra os perfis obtidos permitem identificá-las, a partir de percentagens iguais ou superiores a 5% de leite de vaca em leite de cabra, como

se pode inferir pela observação da Figura 3.7. Os dois picos assinalados na figura como *'a'*, embora se encontrem presentes no perfil cromatográfico do leite de cabra, as suas áreas variam com o aumento da percentagem de adulteração. Por outro lado, o pico assinalado como *'b'*, inexistente no cromatograma referente ao leite de cabra, aparece a partir de uma adulteração de 5%, o que é devido à presença da α-caseína bovina. Este facto é realçado na Figura 3.8. onde se pode observar a variação da área dos picos *'a'*, '2' e *'b'* relativamente à área total do cromatograma, em função da percentagem de adulteração de leite de vaca em leite de cabra.

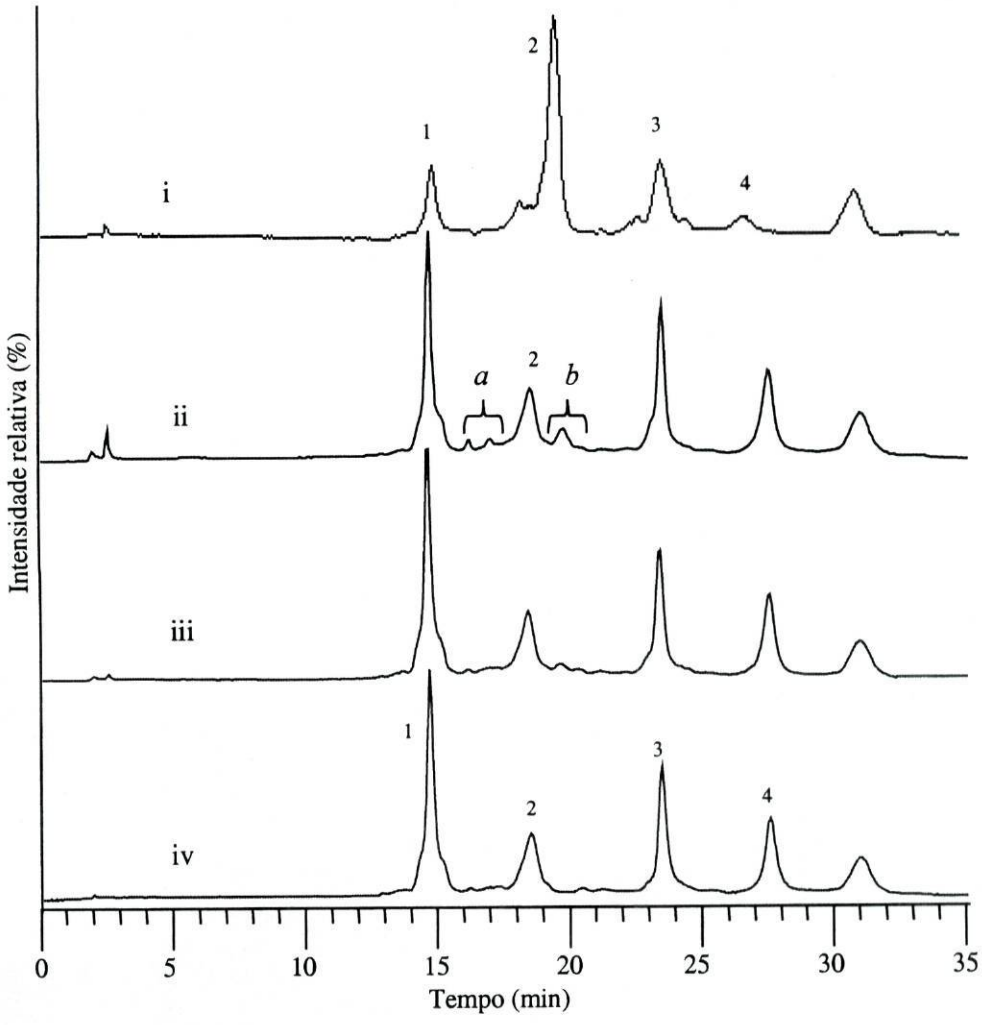


Figura 3.7. – Perfis cromatográficos da caseína inteira bovina e caprina, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: (i) leite de vaca cru; (ii) adulteração de 20% de leite de vaca em leite de cabra; (iii) adulteração de 5% de leite de vaca em leite de cabra; (iv) leite de cabra cru. 1 - κ-caseína; 2 - α-caseína; 3 e 4 - β-caseína.

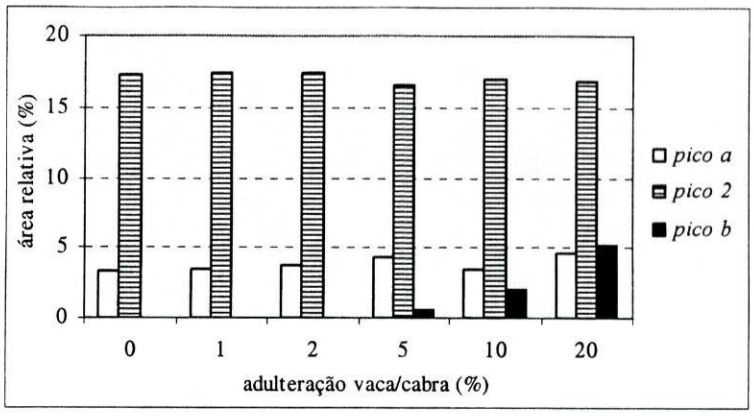


Figura 3.8. – Variação da área relativa dos picos *'a'*, *'2'* e *'b'* com a percentagem de leite de vaca em leite de cabra.

O pico *'b'* poderá permitir a quantificação de adulterações a partir da curva de calibração determinada com base na sua área relativa em função da respectiva percentagem de adulteração que o origina. Esta curva foi determinada a partir dos valores obtidos para as adulterações de 5, 10 e 20% podendo ser visualizada na Figura 3.9.

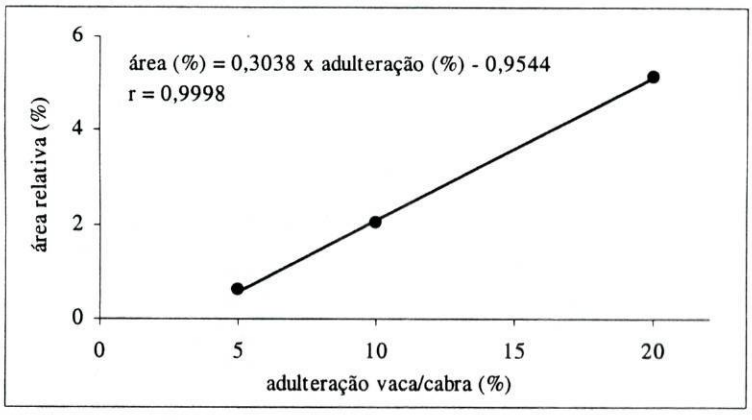


Figura 3.9. – Curva de calibração: área relativa do pico *'b'* em função da percentagem de leite de vaca em leite de cabra.

ii) Quantificação da caseína inteira de ovelha: curva de calibração

Nas condições experimentais utilizadas verifica-se uma relação linear entre a área total dos picos obtidos e a concentração de caseína total de ovelha (Apêndice C). Os parâmetros da curva de calibração e coeficiente de correlação encontram-se na Tabela 3.9. Os coeficientes de variação, em termos de áreas, obtidos para cada nível de concentração,

calculados com base nos resultados de três análises consecutivas, encontram-se compreendidos entre 0,12 e 3,00%.

Tabela 3.9. – Parâmetros da curva de calibração determinados pelo método do padrão externo.

Caseína	Intervalo de concentrações (mg/ml)	n[i]	Declive[ii] (ml/mg)	Ordenada na origem[ii]	r[iii]
Caseína total	0,430 – 4,305	6	2724213 (± 101882)	748596 (± 230712)	0,9994

i: Número de pontos considerados na regressão linear. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em três injecções consecutivas de cada solução padrão.
ii: O erro padrão do declive e da ordenada na origem da regressão é dado entre parêntesis.
iii: Coeficiente de correlação.

Na Figura 3.10. apresenta-se a curva de calibração calculada para a caseína ovina total.

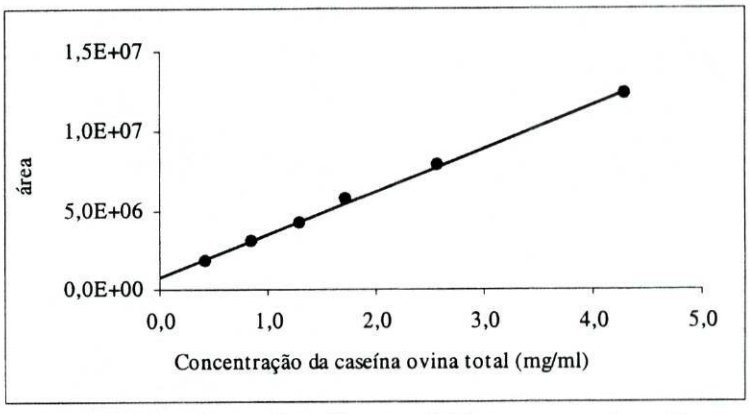


Figura 3.10. – Curva de calibração obtida para a caseína ovina.

O teor de caseína total presente no leite de ovelha estudado foi calculado pela curva de calibração tendo-se obtido o valor de 720,92 (± 28,88) mg em 15 ml de leite, resultado baseado em duas injecções. Este valor está de acordo com o referido por Wong *et al.* (1996), que indica que o leite de ovelha possui um teor de caseína de 60 g/l o que corresponde a 900 mg em 15 ml. De facto, a diferença dos valores encontrado e referido na literatura, é da mesma ordem de grandeza da obtida para o leite de vaca, podendo ser devida às mesmas razões.

iii) Perfis cromatográficos da caseína durante a maturação em queijos tipo Terrincho e queijos comerciais

Procedeu-se ao estudo da proteólise das caseínas de queijos ao longo da maturação através do perfil cromatográfico obtido para a fracção proteica insolúvel a pH 4,6. Para o

efeito, utilizaram-se 5 queijos de vaca, 5 de ovelha, 5 de ovelha adulterados com 10% de vaca e 5 de ovelha adulterados com 20% de vaca, manufacturados de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho. Os perfis cromatográficos obtidos aos 5, 10, 15, 20 e 30 dias de maturação, podem ser visualizados na Figura 3.11.

A análise da Figura 3.11. permite constatar que para o queijo de ovelha, o perfil cromatográfico modifica-se ao longo do tempo de maturação, sendo possível observar uma variação dos picos *'2a'* e *'2b'* face aos restantes. Este facto era de esperar uma vez que se encontra descrito na literatura que é a α-caseína que sofre maior proteólise durante a maturação e, por analogia com o perfil obtido para as caseínas bovinas, o segundo pico corresponderá a essa caseína (Grappin *et al.*, 1985). Verifica-se que aos 30 dias de maturação há uma inversão destes dois picos, tornando-se o pico *'2a'* maior que o pico *'2b'*. Christensen *et al.* (1989) estudaram por RP-HPLC a proteólise do queijo de vaca *Danbo* e verificaram que às 2 semanas de maturação se observa também esta inversão, explicando-a com o aumento considerável da formação do péptido α_{s1}-I. Os picos "3" e "4", que correspondem à β-caseína, não sofrem uma grande variação. Seria de esperar observar-se a formação das γ-caseínas, no entanto, ou o método desenvolvido não consegue resolver estas caseínas ou elas encontram-se em pequenas concentrações, não sendo por isso detectáveis.

O mesmo comportamento de maturação pode ser visualizado para o queijo de ovelha 10% adulterado com vaca. Para este queijo observa-se que aos 15 dias existe já uma inversão dos picos *'2a'* e *'2b'*, contudo, aos 20 dias isso já não acontece. O maior grau de proteólise sofrido pelo queijo analisado ao fim de 15 dias pode ser explicado pelo seu menor tamanho.

Para o queijo de ovelha 20% adulterado, embora a análise da Figura 3.11. indique um aumento do pico *'3'* ao longo da maturação, bem como face ao perfil do queijo de ovelha e ovelha 10% adulterado, tal é devido essencialmente às amostras de caseína analisadas do queijo 20% adulterado estarem mais concentradas. De facto, a área relativa do pico *'3'* mantém-se aproximadamente constante durante os 30 dias de maturação para os diferentes queijos de ovelha 20% adulterados (CV: 1,63%). Por outro lado, para igual período de maturação, as áreas relativas desse pico para os queijos de ovelha e ovelha adulterados, apresentam um coeficiente de variação entre 0,4% e 10,81%.

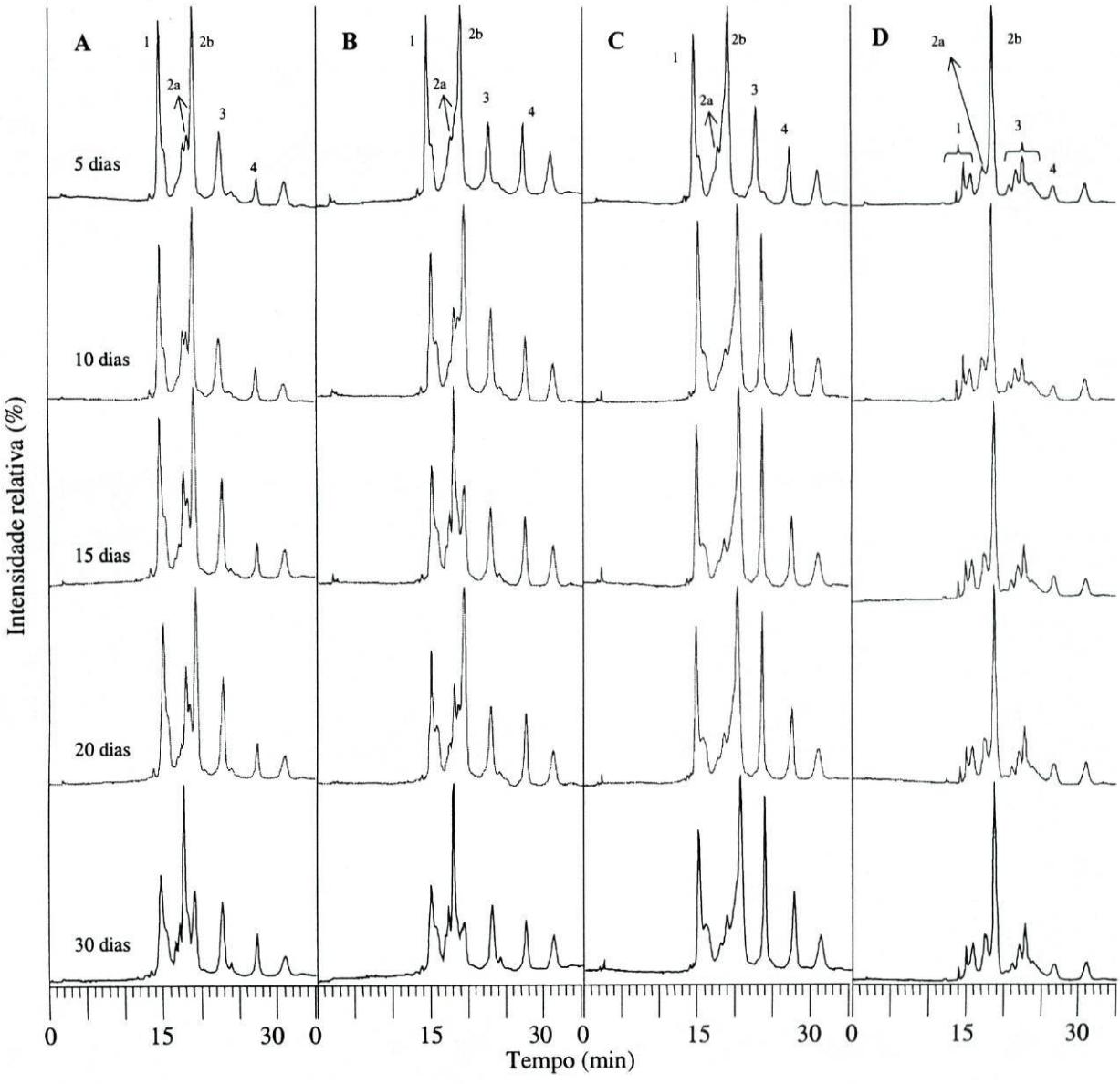


Figura 3.11. – Perfis cromatográficos de caseínas de queijos ao longo da maturação, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: **A** - queijo de ovelha; **B** - queijo de ovelha adulterado com 10% de vaca; **C** - queijo de ovelha adulterado com 20% de vaca; **D** - queijo de vaca.

O perfil cromatográfico obtido para o queijo de vaca não se altera significativamente com o tempo de maturação. Constata-se que, ao contrário do que ocorre com o queijo de ovelha, é o pico referente à β-caseína que apresenta mais alterações, apesar da sua área relativa não variar consideravelmente durante a maturação. A não degradação da α-caseína poderá ser devida ao facto deste queijo apenas se alterar após um maior período de maturação ou poder-se-á dever à actividade proteolítica do coalho utilizado, que não

origina os mesmos compostos de proteólise obtidos para o queijo de ovelha. Com efeito, Christensen *et al.* (1989) estudaram o efeito da actividade de três coalhos na α_{s1} e β-caseína purificadas, tendo constatado a existência de diferenças significativas na hidrólise da α_{s1}-caseína: i) os coalhos de *Mucor miehei* e bovino exibiram actividades proteolíticas, sendo a do primeiro consideravelmente superior; e ii) a actividade do coalho de *Endothia parasitica* não resultou na formação do péptido α_{s1}-I. No entanto, Vanderpooten e Weckx (1972, citado por Christensen *et al.*, 1989) demonstraram que, por análise da fracção azotada não proteica, o coalho de *Endothia parasitica*, exibe uma forte actividade proteolítica no queijo de vaca holandês *Gouda*. Contudo, a análise cromatográfica da fracção proteica insolúvel a pH 4,6, não evidencia essa forte actividade.

Por outro lado, no queijo de vaca verifica-se ainda que a β-caseína apresenta um perfil diferente do encontrado para o leite de vaca, podendo ser devido não só à acção do coalho mas também da plasmina.

A Figura 3.12. mostra a variação da área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'* em função dos dias de maturação, para cada um dos queijos estudados. Esta figura enfatiza as diferenças dos perfis cromatográficos obtidos para os quatro tipos de queijos analisados. Observa-se que são os queijos de ovelha e ovelha 10% adulterado que apresentam uma maior variação no pico referente à α-caseína durante os 30 dias de maturação. De facto, quando se comparam as áreas relativas dos picos *'2a'* e *'2b'*, pela metodologia ANOVA, verificam-se diferenças significativas entre os diferentes dias de maturação para estes queijos ($p<0,0001$; $F=350,16$ e $F=307,90$, respectivamente para os picos *'2a'* e *'2b'*). Para o queijo de ovelha 20% adulterado e de vaca não foram observadas diferenças significativas ao longo da maturação ($p>0,05$).

No entanto, as áreas relativas dos picos *'1'* a *'4'* ao longo da maturação não apresentaram grande alteração, obtendo-se um coeficiente de variação máximo da mesma ordem de grandeza do da variação do método (CV: 6,59%, 5,86%, 3,83% e 5,06% para o queijo de ovelha, adulteração 10%, adulteração 20% e queijo de vaca, respectivamente). Comportamento semelhante é o obtido quando se comparam as áreas relativas dos quatro picos (ver Figura 3.11.) em função do tipo de queijo estudado, para igual período de maturação (CV: 8,93%, 2,63% e 8,90% para o primeiro, segundo e terceiro-quarto picos, respectivamente).

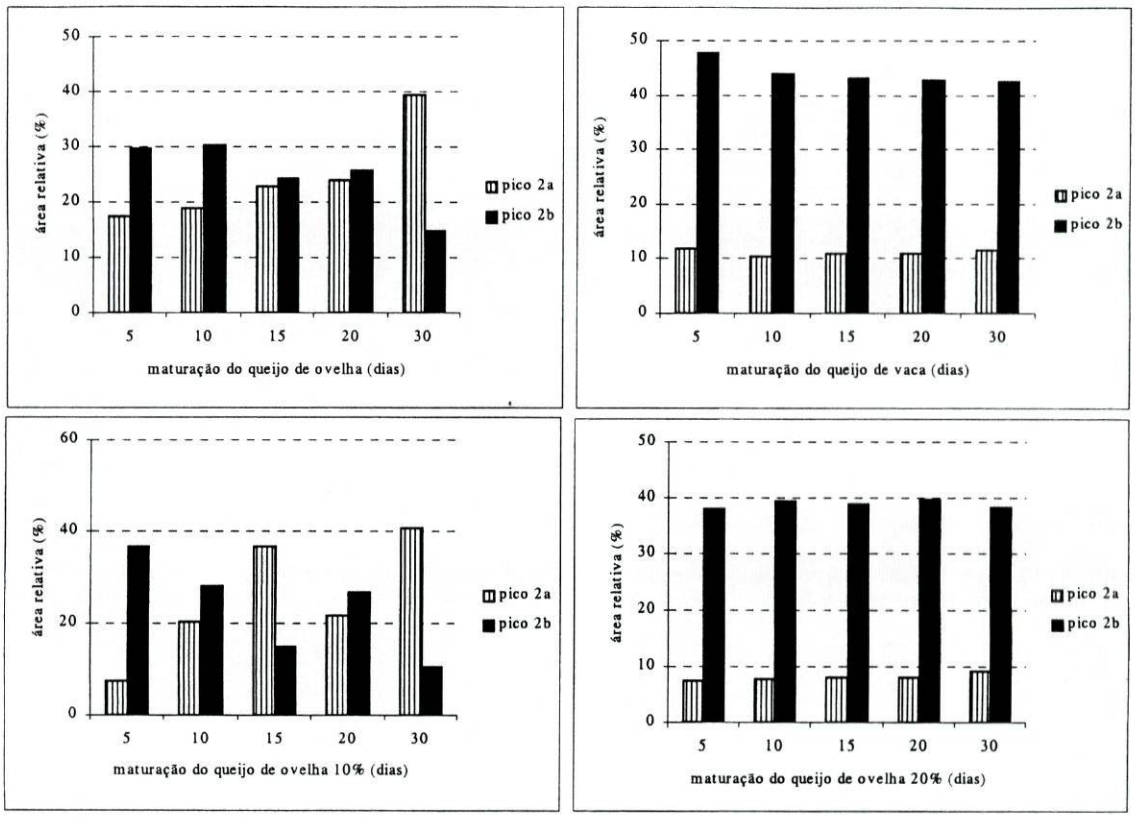


Figura 3.12. – Área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'*: variação com a maturação para os queijos de ovelha, vaca e ovelha adulterado.

Por outro lado, é de realçar que, ao longo da maturação, os picos *'2a'* e *'2b'* do queijo 10% adulterado apresentam um perfil mais próximo do de queijo de ovelha, enquanto que o do queijo 20% adulterado comporta-se como o queijo de vaca. De facto, verifica-se que, aos 30 dias de maturação enquanto que para os queijos de ovelha e de ovelha 10% adulterado há inversão dos picos *'2a'* e *'2b'*, para os queijos de vaca e ovelha 20% adulterado tal não se observa. Com efeito, quando se comparam as áreas relativas dos picos *'2a'* e *'2b'* nos diferentes queijos analisados, pela metodologia ANOVA, constatam-se diferenças significativas entre os queijos de vaca, de ovelha e de ovelha 10% e 20% adulterados, para igual período de maturação ($p<0,0001$; $F=2960,92$ e $F=6343,92$, respectivamente para os picos *'2a'* e *'2b'*). Observa-se que aos 5 dias de maturação os queijos de ovelha 10% e 20% adulterados são significativamente diferentes do queijo de ovelha ($p<0,0001$), no entanto, são semelhantes entre si ($p=1,0000$). Por outro lado, aos 30 dias de maturação o queijo de ovelha 10% adulterado não é significativamente diferente do

queijo de ovelha (p=0,4591), contudo estes dois apresentam-se significativamente diferentes do de 20% adulterado (p<0,0001). Sendo assim, embora a separação cromatográfica não esteja validada para este produto, é possível concluir que a técnica estabelecida contribui para a pesquisa de adulterações. Este facto pode ser constatado pela análise da Figura 3.13.

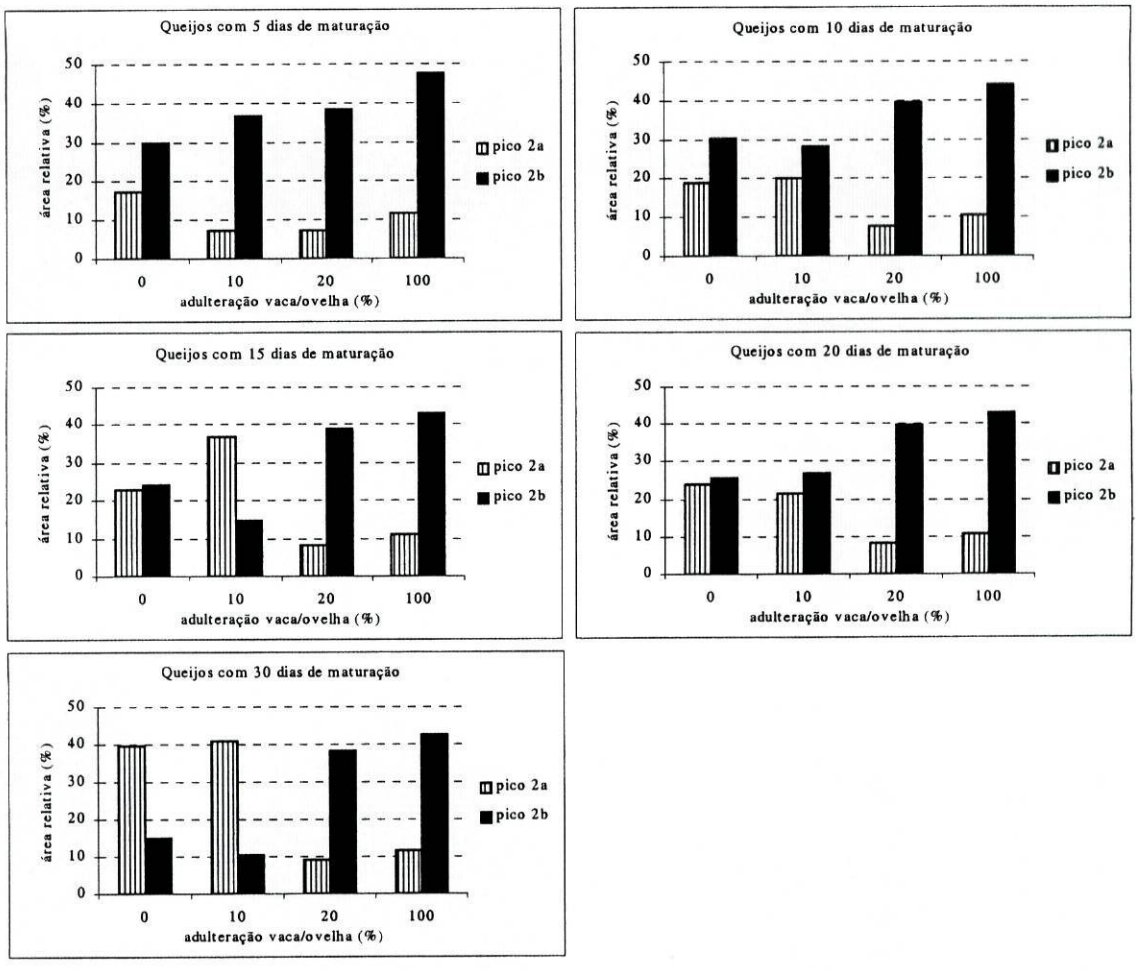


Figura 3.13. – Área relativa dos picos *'2a'* e *'2b'*: variação consoante o grau de adulteração vaca/ovelha para o mesmo período de maturação, para os queijos de ovelha, vaca e ovelha adulterado.

Os resultados obtidos permitem concluir que a técnica cromatográfica desenvolvida neste trabalho poderá ser aplicada ao estudo da maturação e pesquisa de adulterações do Queijo Terrincho, no entanto só parece ser viável para adulterações superiores ou iguais a 20%. De facto, a Figura 3.13. mostra que o queijo de ovelha 10% adulterado apresenta um

comportamento semelhante ao do queijo de ovelha, enquanto que o de 20% adulterado tem um comportamento idêntico ao de vaca durante os 30 dias de maturação estudados.

iv) Avaliação dos perfis cromatográficos da caseína de queijos comerciais

A Figura 3.14. apresenta os perfis cromatográficos obtidos para as caseínas precipitadas a partir de queijos comerciais de vaca, ovelha, cabra e de mistura vaca/ovelha e vaca/cabra/ovelha, adquiridos em superfícies comerciais da região do Porto.

Desta figura observa-se que, os queijos de ovelha, vaca e cabra comerciais apresentam perfis cromatográficos diferentes como seria de esperar. No entanto, o queijo comercial ovelha/vaca estudado apresenta um perfil muito semelhante ao obtido para o queijo de vaca. O perfil obtido parece indicar que o queijo ovelha/vaca contém uma elevada percentagem de leite de vaca. É de realçar que os queijos analisados apresentam um elevado grau de maturação pelo que, nesta situação o método cromatográfico desenvolvido não parece o mais adequado no que se refere à pesquisa de eventuais adulterações.

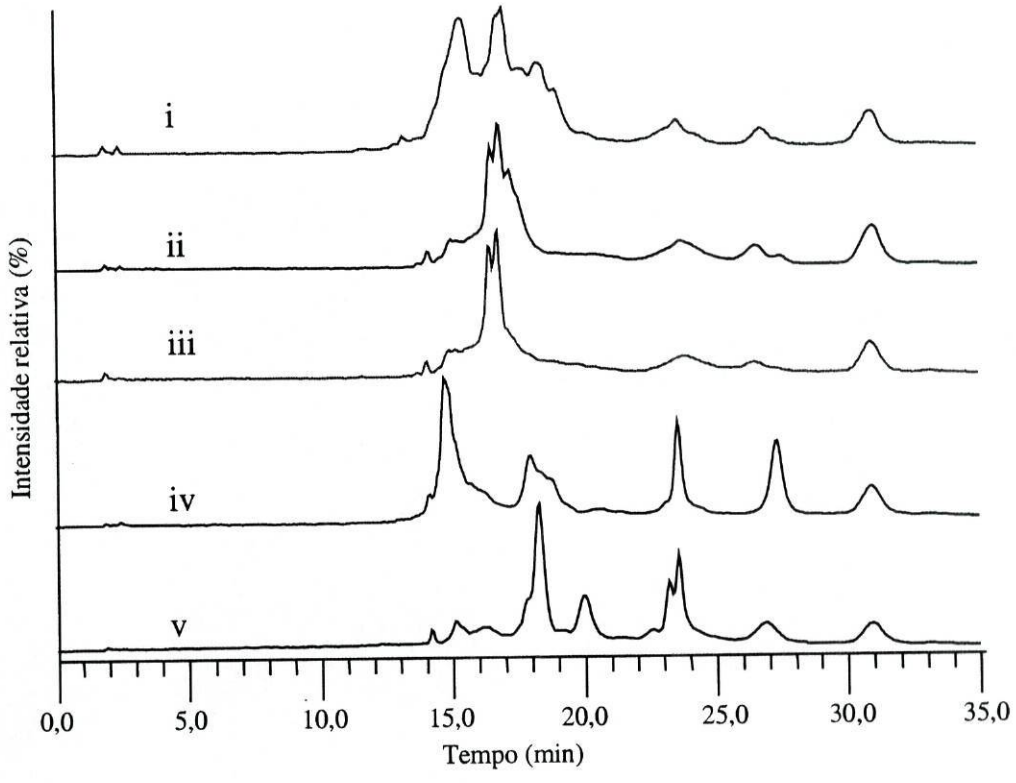


Figura 3.14. – Perfis cromatográficos de caseínas de queijos comerciais, obtidos por RP-HPLC a 280 nm: (i) queijo de ovelha (Terrincho); (ii) queijo de vaca; (iii) queijo de mistura vaca/ovelha; (iv) queijo de cabra; (v) queijo de mistura vaca/cabra/ovelha.

3.3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM UREIA

Como foi anteriormente referido, a electroforese em gel de poliacrilamida tem apresentado grande aplicabilidade no estudo de caseínas de leite de diferentes espécies e da proteólise de queijos fabricados com diferentes tipos de enzimas coagulantes e com leites de diferentes espécies (Furtado, 1983; Grappin *et al.*, 1985; Amigo *et al.*, 1991; Mayer e Hörtner, 1992).

3.3.1. Optimização do método de separação das caseínas

Ao efectuar a preparação das amostras verificou-se que as caseínas dissolviam melhor a pH alcalino, entre 9 e 14. No entanto, constatou-se que o pH ao qual estas se encontravam condicionava a resolução das bandas obtidas. Realizou-se então um ensaio onde se preparam diferentes soluções de padrão de caseína bovina, com a mesma concentração, mas a diferentes valores de pH. Observou-se que as soluções que estavam mais alcalinas, a pH 11, 12 ou 14, apresentavam bandas mais difusas, não estando tão bem separadas. A melhor separação e resolução das diferentes bandas da caseína foi conseguida a pH 9, sendo, por isso, este o pH escolhido para a preparação das amostras.

Observando a Figura 3.15., verifica-se que se conseguiu uma boa resolução das várias caseínas com esta técnica de electroforese. Os perfis obtidos são semelhantes aos apresentados na Figura 3.16 onde se encontra esquematizado o perfil característico das caseínas obtido com a electroforese em gel de poliacrilamida com ureia (Brochiet, 1982 citado por Ramos e Juárez, 1986; Fox e MacSweeney, 1998). Contudo, é possível constatar que com a técnica apresentada se consegue uma melhor resolução, essencialmente para as caseínas caprina e ovina, comparativamente com os resultados apresentados por Brochiet (1982 citado por Ramos e Juárez, 1986) e Fox e MacSweeney (1998).

No perfil obtido para o padrão de caseína inteira de vaca e da fracção da κ-caseína, esta aparece como quatro bandas esbatidas que não se encontram tão bem resolvidas como as conseguidas para as outras fracções de caseína. Resultado semelhante foi conseguido por van Hekken e Thompson (1992), embora apenas tenham obtido duas bandas para a κ-caseína.

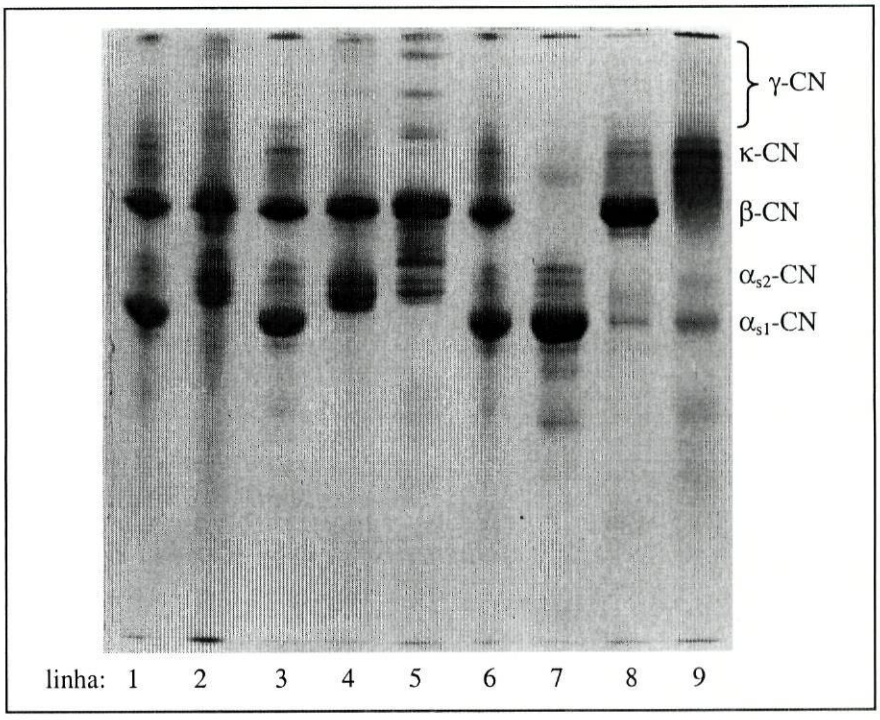


Figura 3.15. – Perfis de caseínas obtidos por ureia-PAGE: (1,6) padrão de caseína bovina; (2) padrão de caseína ovina; (3) leite de vaca; (4) leite de ovelha; (5) leite de cabra; (7) padrão de α-caseína; (8) padrão de β-caseína e (9) padrão de κ-caseína.

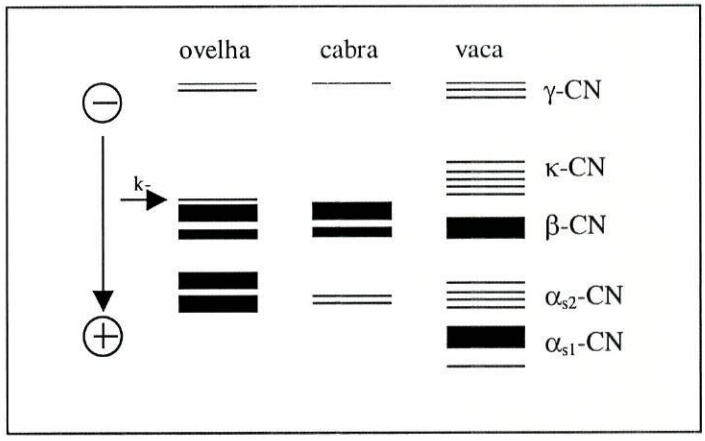


Figura 3.16. – Diagramas esquemáticos dos perfis de caseína obtidos por ureia-PAGE: caseína de leite de vaca adaptado de Fox e MacSweeney (1998); caseína de leite de ovelha e de leite de cabra adaptado de Brochiet (1982) citado por Ramos e Juárez (1986).

Observa-se que as caseínas de leite de vaca, ovelha e cabra (Figura 3.15., linhas 3, 4 e 5, respectivamente) apresentam perfis diferentes. A α-caseína bovina apresenta uma maior mobilidade que a mesma fracção de caseína dos leites de ovelha e cabra. Pode-se ainda

observar que existem também diferenças na região da κ e γ-caseínas, não sendo estas tão visíveis.

As β-caseínas ovina e caprina aparecem como duas bandas intensas com uma mobilidade semelhante à da β-caseína bovina, resultados que são concordantes com os descritos por Furtado (1983), Addeo *et al.* (1988) e Kalantzopoulous (1999). Kaminarides e Anifantakis (1993) conseguiram um perfil idêntico ao apresentado na Figura 3.15. para as caseínas bovinas, ovinas e caprinas, sendo, no entanto, a sua resolução de inferior qualidade. As diferenças nos perfis obtidos permitem antever a possibilidade de detectar adulterações de leite de vaca em leite de ovelha e cabra, principalmente pela diferença de mobilidade da α-caseína das três espécies.

É de realçar ainda, que tal como se verificou anteriormente nos ensaios cromatográficos, também na electroforese se consegue observar que os padrões das fracções de caseína bovina se encontram contaminados pelas outras fracções, principalmente o da β pela κ-caseína.

Nas Figuras 3.17. e 3.18. podem visualizar-se os perfis electroforéticos obtidos para diferentes percentagens de adulteração de leite de vaca em leite de ovelha e em leite de cabra, respectivamente. Os géis apresentados foram revelados por coloração com azul de Coomassie R250, embora, também tenham sido revelados com nitrato de prata. Contudo, para esta última revelação, não se constatou uma melhoria significativa da resolução das bandas.

Pela figura 3.17. e comparando os perfis obtidos para as caseínas dos dois tipos de leite permite detectar claramente percentagens de adulteração de leite de vaca em leite de ovelha a partir dos 5%, atendendo à diferente mobilidade da α_{s1}-caseína bovina relativamente à ovina bem como pela presença da κ-caseína bovina no leite de ovelha, embora a banda correspondente a esta caseína não se encontre tão bem definida. Ramos e Juárez (1986) obtiveram resultados semelhantes conseguindo detectar 5% de leite de vaca em leite de ovelha a partir da α-caseína.

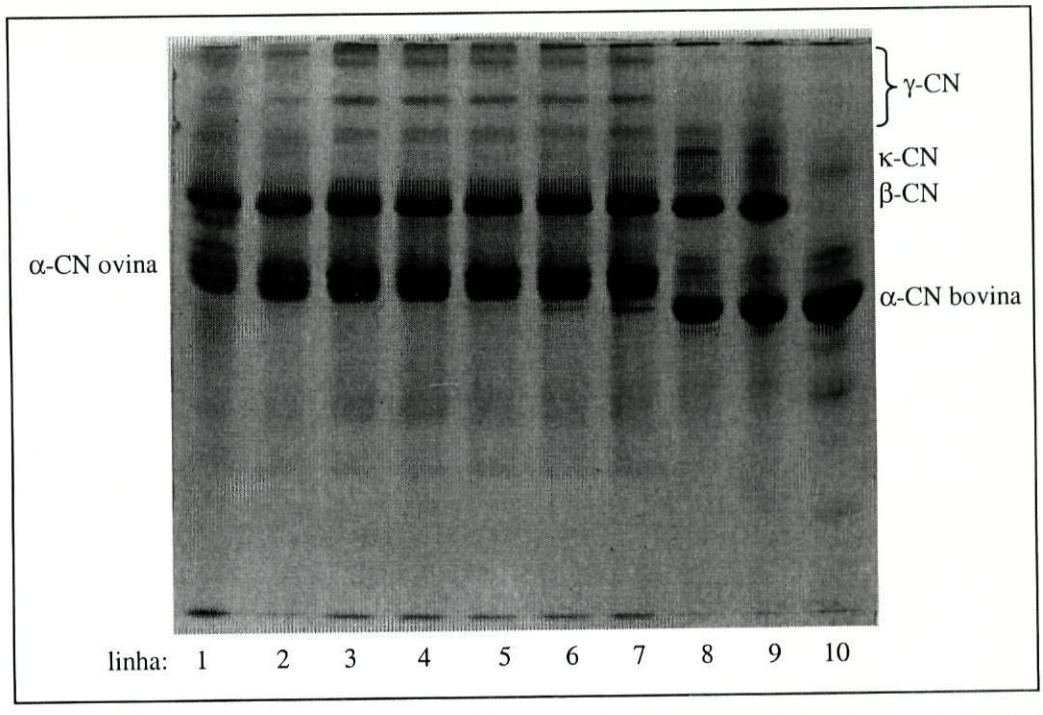


Figura 3.17. – Perfis de caseínas obtidos para adulterações de leite vaca em leite de ovelha: (1) padrão de caseína ovina; (2) leite de ovelha; (3) 1% leite de vaca em leite de ovelha; (4) 2% leite de vaca em leite de ovelha; (5) 5% leite de vaca em leite de ovelha; (6) 10% leite de vaca em leite de ovelha; (7) 20% leite de vaca em leite de ovelha; (8) leite de vaca; (9) padrão de caseína bovina; e (10) padrão de α-caseína.

Os resultados obtidos com este método permitem detectar percentagens de adulteração de leite de vaca em leite de cabra a partir dos 5%, através da presença da banda correspondente à α_{s1}-caseína bovina nos leites de mistura vaca/cabra, o que foi também conseguido por Furtado (1983). No entanto, com a presente técnica, adulterações de 2% podem ser também detectadas pela existência de uma banda pouco definida na região da α_{s1}-caseína bovina. O desempenho da electroforese em gel de poliacrilamida com ureia na pesquisa de adulterações em leites é ainda comparável ao obtido por Cattaneo *et al.* (1996a) por electroforese capilar, que conseguiram detectar 8% e 1% de leite de vaca adicionado a leite de ovelha e cabra, respectivamente. Estes autores observaram igualmente que é mais fácil detectar adulterações de leite de vaca em cabra do que em ovelha, o que vem de encontro aos resultados obtidos quer pela electroforese, quer pela cromatografia.

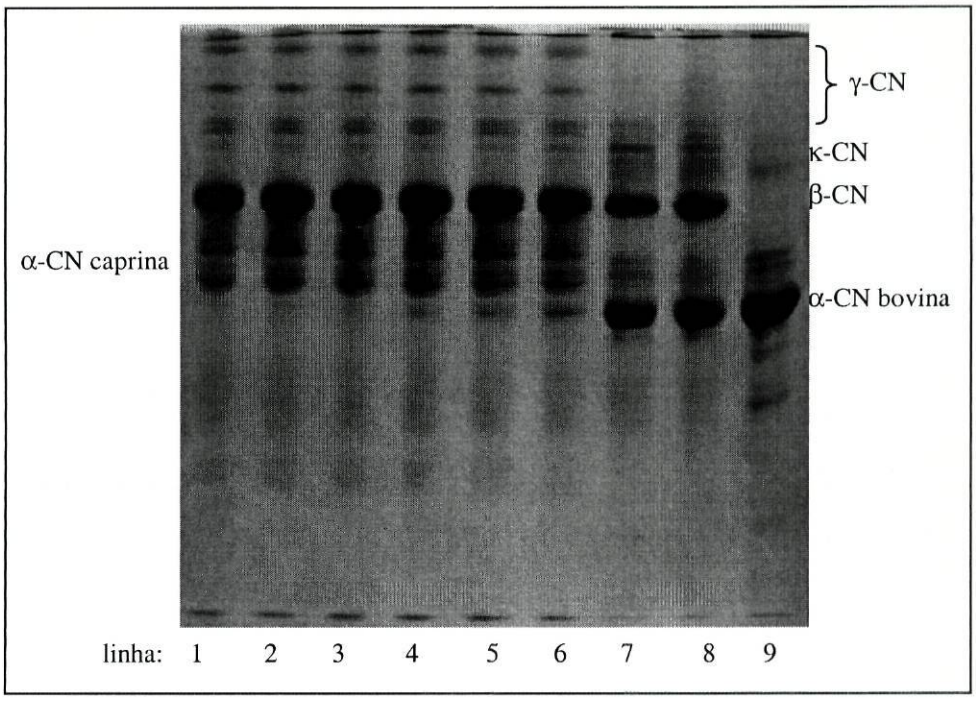


Figura 3.18. – Perfis de caseínas obtidos para adulterações de leite vaca em leite de cabra: (1) leite de cabra; (2) 1% leite de vaca em leite de cabra; (3) 2% leite de vaca em leite de cabra; (4) 5% leite de vaca em leite de cabra; (5) 10% leite de vaca em leite de cabra; (6) 20% leite de vaca em leite de cabra; (7) leite de vaca; (8) padrão de caseína bovina; e (9) padrão de α-caseína.

3.3.2. Análise das caseínas dos queijos

O método electroforético escolhido permitiu uma clara resolução das caseínas precipitadas a partir de queijos manufacturados de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho e de queijos comerciais, ao longo da maturação. Os perfis obtidos podem ser observados nas Figuras 3.19 a 3.23.

Nas Figuras 3.19 e 3.20 pode visualizar-se a proteólise ocorrida durante os 30 dias de maturação nos queijos de ovelha e de vaca manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho.

Os perfis mostram claramente que a banda nativa da α_{s1}-caseína continua bastante visível, no entanto, o queijo de ovelha evidencia uma degradação mais extensa desta caseína. Observa-se ainda o aparecimento de novas bandas com maior velocidade de migração que a banda nativa da α_{s1}-caseína, essencialmente a partir dos 15 dias de

maturação. Um comportamento distinto pode ser observado para a banda nativa da β-caseína, a qual praticamente não sofre modificação, embora seja possível visualizar-se uma ligeira intensificação das bandas na região das γ-caseínas. Este comportamento poderá ser devido à actividade da plasmina uma vez que, segundo alguns autores (Fox, 1989b; Pavia *et al.*, 2000), a β-caseína é mais resistente à acção do coalho animal em comparação com a α-caseína. Este facto deve-se provavelmente a interacções hidrofóbicas intramoleculares entre as regiões hidrófobas da zona C-terminal da β-caseína.

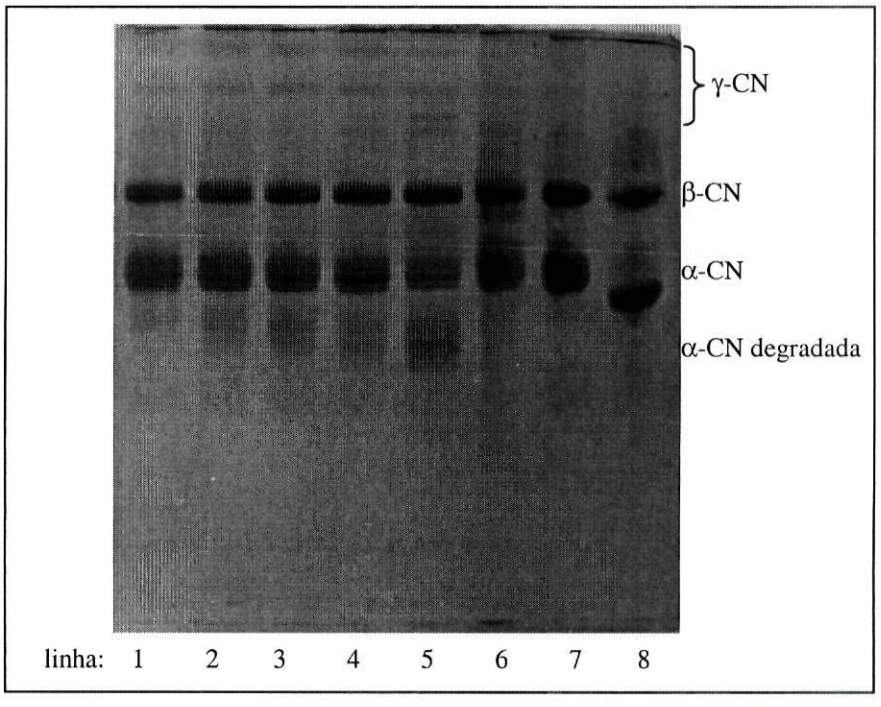


Figura 3.19. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de ovelha manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação: (1) queijo 5 dias; (2) queijo 10 dias; (3) queijo 15 dias; (4) queijo 20 dias; (5) queijo 30 dias; (6) padrão de caseína ovina; (7) leite de ovelha; e (8) padrão de caseína bovina.

As alterações descritas anteriormente são mais evidentes para o queijo de ovelha do que para o de vaca. Para este último, notam-se, tal como nos ensaios de HPLC, diferença entre o leite de vaca e o queijo de vaca com 5 dias, permanecendo durante o restante período de maturação praticamente inalterável. Os resultados obtidos realçam que a electroforese alcalina em gel de poliacrilamida com ureia é uma técnica que pode ser aplicada com sucesso ao estudo da proteólise da α_{s1} e da β-caseína permitindo avaliar o

tempo de maturação dos queijos, o que está de acordo com Grappin *et al.* (1985) e van Hekken e Thompson (1992). Grappin *et al.* (1985) refere que a imediata e extensiva degradação da α_{s1}-caseína, durante a maturação do queijo, origina vários fragmentos que migram uns mais rapidamente que esta caseína e outros na zona entre a α_{s1} e a β-caseína nativas. Este processo poderá conduzir inclusivamente à total hidrólise destas caseínas.

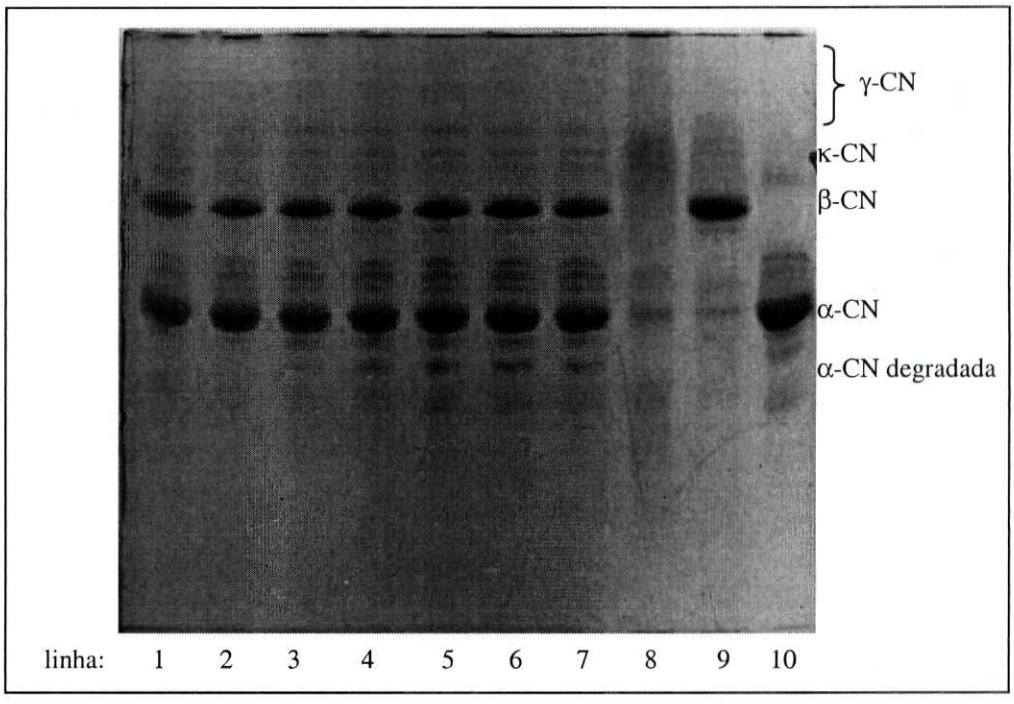


Figura 3.20. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de vaca manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação: (1) padrão de caseína bovina; (2) leite de vaca; (3) queijo 5 dias; (4) queijo 10 dias; (5) queijo 15 dias; (6) queijo 20 dias; (7) queijo 30 dias; (8) padrão de κ-caseína; (9) padrão de β-caseína e (10) padrão de α-caseína.

Este facto constatou-se também em cinco queijos representativos da variedade de queijos comerciais disponíveis no mercado (Figura 3.21.), onde se verifica uma maior degradação dessas caseínas, podendo concluir-se que se trata de queijos com um tempo de maturação bastante longo. Os perfis encontrados para estes queijos são idênticos aos obtidos por Marcos *et al.* (1979), Farkye *et al.* (1991), van Hekken e Thompson (1992), Carretero *et al.* (1994), Addeo *et al.* (1995) e Ruiz e Redondo (1995). Em alguns queijos analisados não foi possível detectar nem a κ nem a *para*-κ-caseína. Embora a ausência da κ-caseína seja natural o mesmo não se pode dizer da *para*-κ-caseína, que resulta da

degradação da κ-caseína pela acção do coalho. Este facto pode dever-se à sua perda durante a etapa de descoloração do gel, processo que está descrito na literatura. Com efeito, a *para*-κ-caseína em condições alcalinas migra em direcção ao cátodo fixando-se acima da origem do gel e desaparecendo rapidamente após a sua descoloração (van Hekken e Thompson, 1992; Carretero *et al.*, 1994). Nos queijos, nomeadamente nos comerciais aparecem várias bandas junto à origem do gel. No entanto, estas deverão corresponder às γ e não às *para*-κ-caseínas.

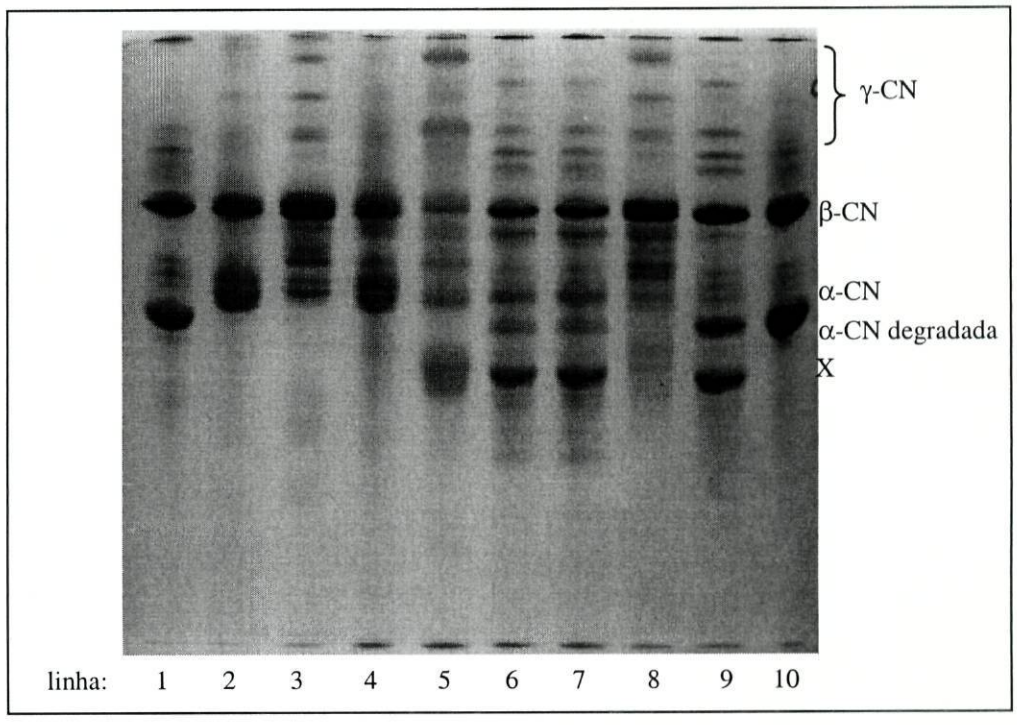


Figura 3.21. – Perfis de caseínas obtidos para leites de diferentes espécies e para os queijos comerciais: (1) leite de vaca; (2) leite de ovelha; (3) leite de cabra; (4) padrão de caseína ovina; (5) Queijo Terrincho; (6) queijo de vaca; (7) queijo de mistura ovelha/vaca; (8) queijo de cabra; (9) queijo de mistura vaca/cabra/ovelha; e (10) padrão de caseína bovina.

Comparando o perfil encontrado para o Queijo Terrincho comercial (Figura 3.21., linha 5) com os perfis obtidos na Figura 3.19 (linhas 3 a 7) verifica-se que existe um grau de proteólise muito superior para o primeiro logo um maior tempo de maturação. Os resultados obtidos indicam que os queijos comerciais de mistura vaca/ovelha (linha 7), vaca/cabra/ovelha (linha 9) analisados contêm uma grande percentagem de leite de vaca, em virtude da grande semelhança com o perfil obtido para o queijo de vaca comercial

(linha 6). Esta conclusão está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios cromatográficos. Nestes queijos aparece ainda uma banda, designada por *'X'*, que apesar de não ter sido identificada poderá corresponder à α-la bovina, em virtude dos leites utilizados no fabrico desses queijos serem pasteurizados, pelo que as proteínas do soro desnaturadas precipitam com as caseínas a pH 4,6 (Morr, 1985; Nielsen e Waagner, 1988; Funtenberger *et al.*, 1997). van Hekken e Thompson (1992), na análise de proteínas de queijos, identificaram uma banda semelhante como sendo a α-la bovina. A β-lg bovina poderá estar igualmente presente na região entre a β e a α-caseína, embora não seja evidente atendendo aos numerosos produtos de degradação dessas caseínas.

O método electroforético desenvolvido neste trabalho foi ainda aplicado ao estudo de adulterações de queijos de ovelha tipo Terrincho com leite de vaca, durante a maturação (Figuras 3.22. e 3.23.).

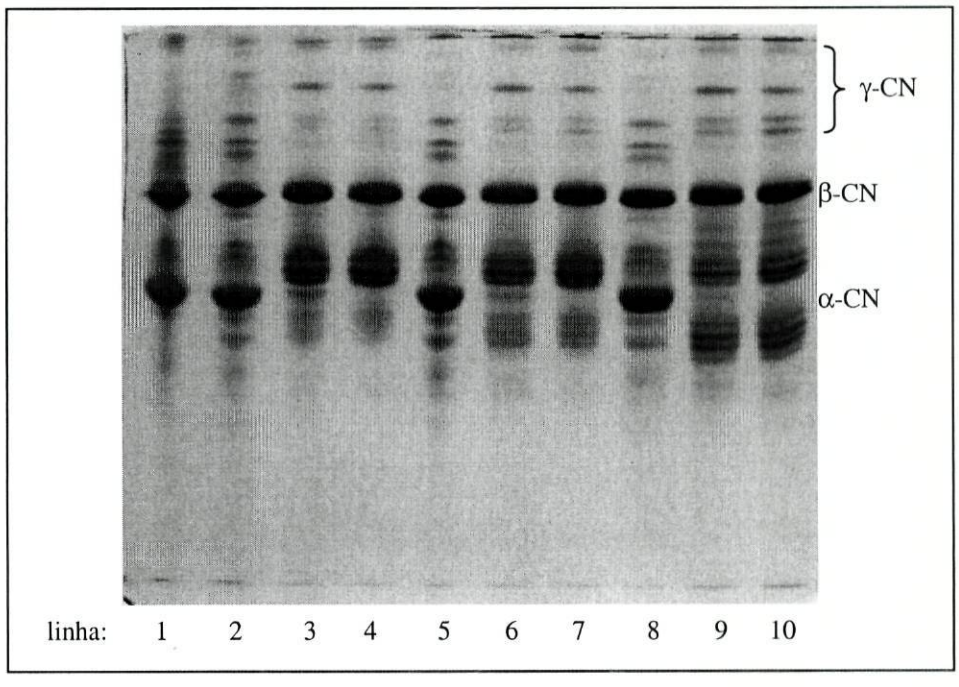


Figura 3.22. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de ovelha com uma adulteração 10% de vaca, manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação: (1) padrão de caseína bovina; (2) queijo de vaca 10 dias; (3) queijo 10% 10 dias; (4) queijo de ovelha 10 dias; (5) queijo de vaca 20 dias; (6) queijo 10% 20 dias; (7) queijo de ovelha 20 dias; (8) queijo de vaca 30 dias; (9) queijo 10% 30 dias; e (10) queijo de ovelha 30 dias.

A análise das Figuras 3.22. e 3.23. permite concluir que é possível detectar percentagens de adulteração de 10 e 20% até aos 30 dias de maturação, a partir da presença da banda da α_{s1}-caseína bovina. No entanto, aos 30 dias de maturação, esta banda é mais evidente para os queijos com 20% de adulteração.

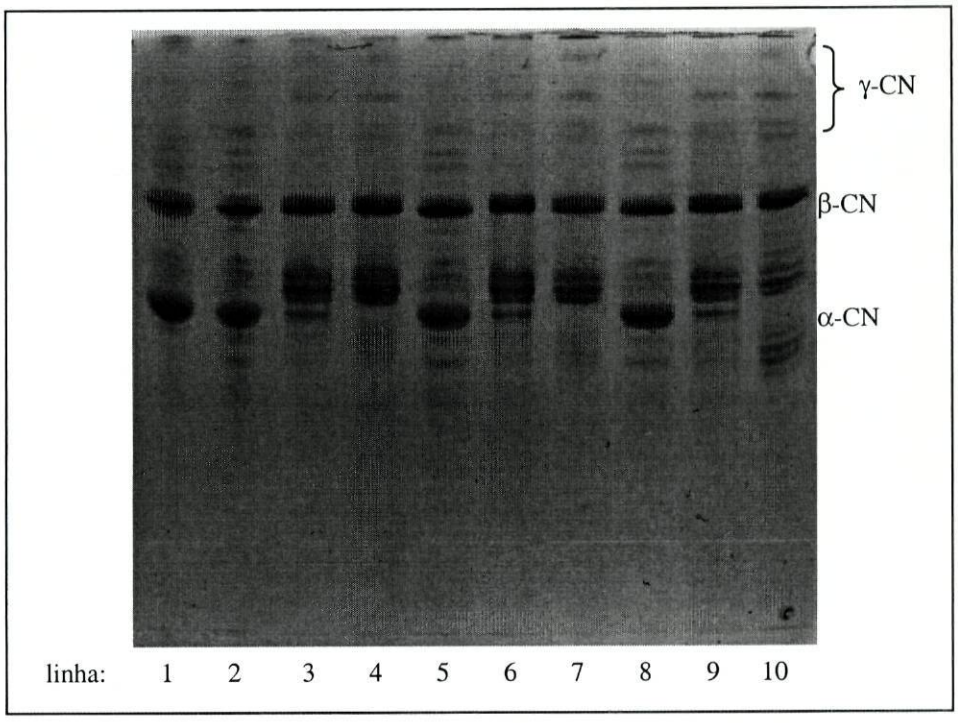


Figura 3.23. – Perfis de caseínas obtidos para os queijos de ovelha com uma adulteração 20% de vaca, manufacturados de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho, ao longo dos 30 dias de maturação: (1) padrão de caseína bovina; (2) queijo de vaca 10 dias; (3) queijo 20% 10 dias; (4) queijo de ovelha 10 dias; (5) queijo de vaca 20 dias; (6) queijo 20% 20 dias; (7) queijo de ovelha 20 dias; (8) queijo de vaca 30 dias; (9) queijo 20% 30 dias; e (10) queijo de ovelha 30 dias.

A detecção de adulterações foi mais difícil nos queijos do que em leites uma vez que, a degradação das caseínas ovinas mascararam a banda da α_{s1}-caseína bovina, sendo esta a que permite a detecção das adulterações. Ramos e Juárez (1986) obtiveram também como limite de detecção 10% de leite de vaca em queijos de ovelha mas até 10 dias de maturação, enquanto que com a técnica descrita neste trabalho, conseguiu-se uma detecção até aos 30 dias de maturação, para igual percentagem de adulteração.

Na Figura 3.22. verifica-se ainda que o queijo de ovelha 10% adulterado apresenta um perfil de proteólise semelhante ao obtido para o queijo de ovelha. Por outro lado, da Figura 3.23. constata-se que no queijo de ovelha 20% adulterado são menos numerosas as bandas com mobilidade superior à α-caseína. Deste modo, o perfil do queijo de ovelha 20% adulterado é mais semelhante que o de 10% adulterado, ao do queijo de vaca, resultado que está de acordo com o obtido para o HPLC. Atendendo ao anteriormente mencionado bem como o referido para o Queijo Terrincho comercial, possíveis adulterações serão mais facilmente detectadas no primeiro mês de comercialização.

3.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICA E ELECTROFORÉTICA

Os diferentes mecanismos de separação da electroforese e do HPLC fazem com que estas técnicas sejam complementares na análise das diferentes proteínas do leite, apresentando um elevado grau de correspondência e podendo fornecer informações adicionais nos resultados da análise. Deste modo, é lícito proceder a uma comparação entre as técnicas desenvolvidas neste trabalho.

A preparação das amostras e dos solventes utilizados na técnica de HPLC requereu procedimentos mais fáceis e com menor manipulação que na electroforese. O tempo de análise de uma corrida em HPLC foi de 35 minutos enquanto que na electroforese durou cerca de 2 horas e 30 minutos. No entanto, é de realçar que nesta última eram analisadas em simultâneo 10 amostras, pelo que se apresenta mais vantajosa.

Uma das limitações da electroforese consiste na dificuldade em proceder a uma análise quantitativa dos resultados devido a problemas de reprodutibilidade. Para o HPLC foram estabelecidas curvas de calibração para a caseína bovina (e suas fracções) e ovina que permitiram a quantificação destas proteínas em leites de vaca cru, do dia, UHT, em pó e em leite de ovelha cru. Os resultados obtidos são da mesma ordem de grandeza dos teoricamente estabelecidos para estes leites, como anteriormente referido.

Para ambas as técnicas foi possível separar as principais fracções das caseínas bovina, ovina e caprina (α, β, κ-caseína), no entanto apenas para a electroforese foi possível resolver a α_{s2} e as γ-caseínas.

No que se refere à pesquisa de adulterações de leite de vaca em leites de ovelha e de cabra, a electroforese revelou-se, globalmente, a técnica mais eficiente. Enquanto que, o HPLC não permitiu identificar a presença de caseína bovina nas amostras de leite de ovelha adulterado, na electroforese foi visível a adulteração a partir dos 5%. No que se refere às adulterações de leite de vaca em leite de cabra, a electroforese permitiu a detecção a partir dos 2%, sendo de 5% para o HPLC. Contudo, convém realçar que, os resultados obtidos com a técnica de HPLC indiciam a possibilidade de quantificar a presença de caseína bovina em leites de cabra, através de uma curva de calibração da área relativa do pico resultante da adulteração em função da percentagem de adulteração que o origina.

Ambas as técnicas permitiram verificar a proteólise ao longo dos 30 dias de maturação do queijo de ovelha manufacturado de acordo com a tecnologia do Queijo Terrincho. Constatou-se que é a α-caseína que sofre maior degradação ao longo desse período, enquanto que as restantes fracções permanecem praticamente inalteráveis. Este resultado está de acordo com o que se encontra descrito na literatura. Quanto ao queijo de vaca manufacturado de acordo com a mesma tecnologia, verificou-se que a electroforese foi a técnica mais sensível na avaliação da proteólise.

Na pesquisa de adulterações dos queijos tipo Terrincho constatou-se que ambas as técnicas permitem a sua identificação. Contudo, com base nos perfis cromatográficos obtidos apenas é possível detectar uma adulteração de 20%, enquanto que a observação dos géis obtidos por electroforese permite identificar adulterações de 10%. Convém no entanto referir que, em ambas as técnicas a pesquisa de adulterações é dificultada pela proteólise, sendo possível detectar 20% de adulteração durante os 30 dias de maturação.

Quanto aos queijos comerciais estudados (vaca, ovelha, cabra, ovelha/vaca e vaca/cabra/ovelha) a electroforese revelou-se a técnica mais satisfatória na detecção das misturas, embora o HPLC também tenha permitido identificá-las. É de esperar que, a qualidade dos resultados obtidos por HPLC possa ser melhorada após a optimização das condições cromatográficas, tendo em vista a separação e identificação de péptidos característicos formados durante a degradação das caseínas dos diferentes leites.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a ideia de que a combinação destas técnicas é um instrumento válido na análise das proteínas do leite e controlo da qualidade dos produtos lácteos, nomeadamente queijos.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

O trabalho elaborado e apresentado anteriormente permite estabelecer um conjunto de conclusões relativas aos métodos de HPLC em fase reversa e electroforese em gel de poliacrilamida aplicados à análise de caseínas de leite e de queijos.

A metodologia de RP-HPLC com detecção UV a 280 nm desenvolvida mostrou-se bastante simples e eficiente. Separou e quantificou simultaneamente as fracções principais da caseína bovina. Apresentou uma resposta linear para a caseína total, α, β e κ-caseínas com um coeficiente de correlação superior a 0,9988. O método descrito é preciso (CV inferior a 3,67 e 4,46% para análises realizadas no mesmo dia e em dois dias diferentes), exacto (percentagem de recuperação entre 91 e 100%), com uma boa resolução e um procedimento de preparação de amostras, eluentes e tempos de análises reduzidos. Esta técnica não conseguiu resolver nem as α_{s2} nem as γ-caseínas nos leites. As primeiras eluiram conjuntamente com a α-caseína e as γ poderão estar ausentes ou em concentrações não detectáveis.

As fracções de caseína do leite de vaca, ovelha e cabra foram satisfatoriamente separadas com as condições cromatográficas usadas. Mais ainda, os perfis obtidos para a caseína ovina e caprina mostram claramente que a β-caseína é constituída por dois picos (β_1 e β_2), já descritos na literatura. Os resultados obtidos para a composição das fracções da caseína do leite de vaca, caseína total do mesmo leite e para o leite de ovelha foram da mesma ordem de grandeza dos valores de referência descrito para estes leites.

Os perfis cromatográficos obtidos para as caseínas de leite de vaca, ovelha e cabra foram diferentes, em especial os de vaca e cabra, permitindo detectar adulterações de 5% (v/v) de leite de vaca em leite de cabra, através da α-caseína. Com base nos resultados obtidos, a quantificação desta adulteração apresenta-se promissora, sendo para isso aconselhável a realização de maior número de análises de amostras com diferentes percentagens de adulteração. No entanto, não foi possível detectar adulterações inferiores ou iguais a 20% de leite de vaca em leite de ovelha. Contudo, o estabelecimento de um gradiente de eluição específico para estas misturas poderá viabilizar a pesquisa destas adulterações.

O método foi aplicado com sucesso ao estudo da proteólise da caseína durante 30 dias de maturação de queijos de ovelha, de ovelha adulterados e de vaca manufacturados de acordo com a tecnologia de fabrico do Queijo Terrincho. Obteve-se uma resolução das

várias fracções, embora as γ-caseínas não tenham sido eficazmente separadas da β-caseína. Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos na literatura, sendo a α-caseína a que sofre maior proteólise.

Pesquisou-se também a existência de adulterações de leite de vaca em queijos de ovelha. Os perfis cromatográficos obtidos para o queijo de ovelha e de ovelha 20% adulterado, aos 30 dias de maturação, são diferentes, sendo este último semelhante ao obtido para o queijo de vaca, permitindo assim identificar a adulteração.

O estudo da proteólise bem como de adulterações em queijos estendido à fracção proteica solúvel a pH 4,6 poderia, atendendo aos resultados obtidos por outros autores, melhorar e reforçar as conclusões extraídas. A pesquisa de péptidos e aminoácidos contidos nesta fracção poderia não só auxiliar a estabelecer um perfil de proteólise mas também na pesquisa de adulterações, com base na análise de um péptido específico resultante da proteólise da caseína de leite de vaca (Addeo *et al.*, 1992, 1994; Ferranti *et al.*, 1997). Contudo, de acordo com Li-Chan *et al.* (1992), colunas de poliestireno divinilbenzeno, semelhantes à disponível para a realização deste trabalho, não conseguem resolver essa fracção, eluindo todos os componentes num único pico, praticamente após a injecção.

Dos resultados aqui obtidos pode inferir-se acerca da informação potencial que poderá ser extraída pela análise da fracção proteica insolúvel a pH 4,6, relativa ao estudo da proteólise e à pesquisa de adulterações.

A electroforese em gel de poliacrilamida com ureia revelou-se uma técnica de análise das caseínas de leite e queijos rápida, eficiente e sensível, conseguindo resolver eficientemente as caseínas bovina, ovina e caprina (α, β, κ, γ). Porém, a preparação das amostras requer procedimentos morosos e mais complexos do que os de HPLC. Foi possível detectar adulterações de leite de vaca em leite e queijo de ovelha e em leite de cabra. O método apresentou-se bastante sensível conseguindo-se detectar 2%, 5% e 10% de leite de vaca em leite de cabra, em leite de ovelha e em queijo de ovelha, respectivamente. Para o queijo de ovelha essa detecção foi possível até aos 30 dias de maturação. Na análise dos queijos obteve-se uma boa resolução das bandas conseguindo-se visualizar a proteólise das caseínas. Foi possível observar a degradação das α e β-caseínas, que originaram péptidos com maior mobilidade e as γ-caseínas, devido principalmente à acção proteólica do coalho e da plasmina. Nos queijos comerciais estudados, apesar do

elevado período de maturação, foi ainda possível observar a proteólise da caseína. Para os queijos de mistura vaca/ovelha e vaca/ovelha/cabra, com base nos perfis electroforéticos obtidos, poderá concluir-se que foi utilizada uma elevada percentagem de leite de vaca no fabrico destes queijos, uma vez que apresentam perfis semelhantes ao de queijo de vaca comercial. Este facto, poderá potenciar a possibilidade de utilização desta técnica na detecção de adulterações de queijos de ovelha e de cabra durante um longo período de maturação, desde que as percentagens de leite de vaca sejam elevadas.

Finalmente, pode-se concluir que apesar dos péptidos detectados por electroforese em gel de poliacrilamida serem provavelmente demasiado grandes para terem um impacto directo no aroma e sabor dos queijos, reflectem o estado geral do processo de maturação e por isso poderão ser úteis como índice indirecto da qualidade e maturação.

Tanto o método de HPLC em fase reversa como o de electroforese em gel de poliacrilamida desenvolvidos, individualmente ou em conjunto, parecem bastante eficientes no estudo das caseínas de leites de vaca, ovelha e cabra, bem como na avaliação da autenticidade e qualidade de queijos.

Apesar da importância dos resultados obtidos torna-se clara a necessidade de futuramente se proceder ao aprofundamento deste estudo. Atendendo à inexistência de padrões comerciais para as fracções de caseína ovina e caprina e à boa separação cromatográfica conseguida, a identificação destas poderá ser obtida por recolha dessas fracções e posterior análise por electroforese. Por outro lado, na análise cromatográfica, poder-se-ão utilizar comprimentos de onda na ordem dos 214 e 220 nm, para estudar os produtos de degradação das caseínas na proteólise de queijos que não absorvam a 280 nm.

Na pesquisa de adulterações, quer em leites, quer em queijos, poderá ser utilizada electroforese seguida de *immunoblotting* com vista à detecção de menores percentagens de adulteração. Poder-se-ão ainda realizar ensaios electroforéticos de modo a obter uma semi-quantificação da degradação das caseínas, utilizando um densitómetro, com vista a estabelecer um índice de proteólise que caracterize a maturação dos queijos.

O trabalho efectuado deixa em aberto directrizes para o prosseguimento dos esforços de investigação nesta área.

BIBLIOGRAFIA

- Addeo, F., Mauriello, R. e Luccia, A.D., (1988), "A gel electrophoretic study of caprine casein", *J. Dairy Res.*, 55, pp. 413-421.
- Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccio, U., Ferranti, P. e Malorni, A., (1992), "Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese", *J.Dairy Res.*, 59, pp. 401-411.
- Addeo, F., Chianese, L., Sacchi, R., Musso, S.S., Ferranti, P. e Malorni, A., (1994), "Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/l", *J.Dairy Res.*, 61, pp. 365-374.
- Addeo, F., Garro, G., Intorcia, N., Pellegrino, L., Resmini, P. e Chianese, L., (1995), "Gel electrophoresis and immunoblotting for the detection of casein proteolysis in cheese", *J. Dairy Res.*, 62, pp. 297-309.
- Alais, C., (1985), "Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera", Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 2ª edição.
- Amigo, L., Ramos, M. e Martin-Alvarez, P.J., (1991), "Effect of technological parameters on electrophorectic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses", *J. Dairy Sci.*, 74, 5, pp. 1482-1490.
- Andrews, A.T., (1983), "Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins", *J. Dairy Res.*, 50, pp. 45-55.
- Andrews, A.T., Taylor, M.D. e Owen, A.J., (1985), "Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 348, pp. 177-185.
- Andrews, A.T., (1992), "Indigenous enzymes in milk", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 8, pp. 286-292.
- Barbano, D.M. e Dellavalle, M.E., (1987), "Rapid method for determination of milk casein content by infrared analysis", *J. Dairy Sci.*, 70, 8, pp. 1524-1528.

- Barbano, D.M., Clark, J.L., Dunham, C.E. e Fleming, J.R., (1990), "Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: collaborative study", *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 73, 6, pp. 849-859.
- Barbano, D.M., Lynch, J.M. e Fleming, J.R., (1991), "Direct and indirect determination of true protein content of milk by kjeldahl analysis: collaborative study", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 2, pp. 281-288.
- Barbosa, L., (1998), "Processo de controlo e certificação do Queijo Terrincho denominação de origem protegida", *Via Lactea*, nº 13, Julho, pp. 43-44.
- Basch, J.J., Douglas Jr., F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H. e Farrell Jr., H.M., (1985), "Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure", *J. Dairy Sci.*, 68, 1, pp. 23-31.
- Beer, M., Krause, I., Stapf, M., Schwarzer, C. e Klostermeyer, H., (1996), "Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of native and heat-denatured bovine β-lactoglobulin in ewes' and goats' milk cheese", *Z Lebensm Unters Forsch*, 203, pp. 21-26.
- Bican, P., (1983), "High performance liquid chromatography of casein peptides", *J. Dairy Sci.*, 66, 10, pp. 2195-2197.
- Bobe, G., Beitz, D.C., Freeman, A.E. e Lindberg, G.L., (1998), "Separation and quantification of bovine milk proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2, pp. 458-463.
- Bradford, M.M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248-254.
- Brunner, J.R., (1976), "Characteristics of edible fluids of animal origin: milk", em Owen R. Rennema (editor), Principles of Food Science - 1: Food Chemistry, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Volume 4, Capítulo 14, pp. 619-656.
- Brunner, J.R., (1981),"Cow milk proteins: Twenty-five years of progress", *J. Dairy Sci.*, 64, 6, pp. 1038-1054.

- Canada, J.S.B., (1998), "Caracterização dos queijos tradicionais portugueses", *Via Lactea*, nº 12, Janeiro, pp. 32-34.
- Carles, C. e Ribadeau-Dumas, B., (1986), "Determination of gradient elution conditions for the separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography: bovine β-casein tryptic digest", *J.Dairy Res.*, 53, pp. 595-600.
- Carles, C., (1986), "Fractionation of bovine caseins by reverse phase high performance liquid chromatography: identification of a genetic variant", *J.Dairy Res.*, 53, pp. 35-41.
- Carretero, C., Trujillo, A.-J., Mor-Mur, M., Pla, R. e Guamis, B., (1994), "Electrophorectic study of casein breakdown during ripening of goat's milk cheese", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 7, pp. 1546-1550.
- Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R. e Masci, M., (1999), "Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions", *J. Chromatogr. A*, 846, pp. 135-141.
- Casper, J.L.,Wendorff, W.L. e Thomas, D.L., (1998), "Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses", *J. Dairy Sci.*, 81,12, pp. 3117-3122.
- Cattaneo, T.M.P., Nigro, F. e Greppi, G.F., (1996a), "Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by capillary zone electrophoresis (CZE): preliminary approach", *Milchwissenschaft*, 51, 11, pp. 616-619.
- Cattaneo, T.M.P., Nigro, F., Toppino, P.M. e Denti, V., (1996b), "Characterization of ewe's milk by capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 721, pp. 345-349.
- Cayot, P. e Lorient, D., (1997), "Structure-function relationships of whey proteins", em S. Damodaran e A. Paraf (editor), Food proteins and their applications, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Capítulo 8, pp. 225-243.
- Chaplin, L.C., (1986), "Hydrophobic interaction fast protein liquid chromatography of milk proteins", *J. Chromatogr.*, 363, pp. 329-335.
- Chen, F.-T.A. e Zang, J.-H., (1992), "Determination of milk proteins by capillary electrophoresis", *J. AOAC Int.*, 75, 5, pp. 905-909.

- Chianese, L., Mauriello, R., Moio, L., Intorcia, N. e Addeo, F., (1992), "Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques", *J. Dairy Res.*, 59, pp. 39-47.
- Christensen, T.M.L.E., Kristiansen, K.R. e Madsen, J.S., (1989), "Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography", *J.Dairy Res.*, 56, pp. 823-828.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. e Catignani, G.L., (1983), "Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins", *J. Dairy Sci.*, 66, 6, pp. 1219-1227.
- Cifuentes, A., Frutos, M. de e Diez-Masa, J.C., (1993), "Analysis of whey proteins by capillary electrophoresis using buffer-containing polymeric additives", *J. Dairy Sci.*, 76, 7, pp. 1870-1875.
- Clare, D.A. e Swaisgood, H.E., (2000), "Bioactive milk peptides: A prospectus", *J. Dairy Sci.*, 83, 6, pp. 1187-1195.
- Creamer, L.K., Plowman, J.E., Liddell, M.J., Smith, M.H. e Hill, J.P., (1998), "Micelle stability: κ-casein structure and function", *J. Dairy Sci.*, 81, 11, pp. 3004-3012.
- Dalgleish, D.G., (1992), "The enzymatic coagulation of milk", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 14, pp. 579-619.
- Dalgleish, D.G., (1997), "Structure-function relantionships of caseins", em S. Damodaran e A. Paraf (editor), Food proteins and their applications, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Capítulo 7, pp. 199-223.
- Douglas Jr., F.W., Greenberg, R., Farrell Jr., H.M. e Edmondson, L.F., (1981), "Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins", *J. Agric. Food Chem.*, 29, pp. 11-15.
- Duncan, S.E., (1998), "Dairy products: The next generation. Altering the image of dairy products through technology", *J. Dairy Sci.*, 81, 4, pp. 877-883.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell Jr., H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R. e Whitney, R.Mcl., (1984), "Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision, *J. Dairy Sci.*, 67, 8, pp. 1599-1631.

- Elgar, D.F., Norris, C.S., Ayers, J.S., Pritchard, M., Otter, D.E., Palmano, K.P., (2000), "Simultaneous separation and quantification of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high performance liquid cromatography on polystyrene-divinylbenzene", *J. Chromatogr. A*, 878, pp. 183-196.
- Farkye, N.Y., Kiely, L.J., Allshouse, R.D. e Kindstedt, P.S., (1991), "Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage", *J. Dairy Sci.*, 74, 5, pp. 1433-1438.
- Ferranti, P., Barone, F., Chianese, L., Addeo, F., Scaloni, A., Pellegrino, L. e Resmini, P., (1997), "Phosphopeptides from Grana Padano cheese: nature, origin and changes during ripening", *J.Dairy Res.*, 64, pp. 601-615.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E., Marques, J. e Ferreira, M.A., (2000), "Development, validation, and application of na HPLC/UV method for quantification of casein in infant formulae and follow-up milks", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23, 13, pp. 2057-2065.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E. e Ferreira, M.A., (2001, em publicação), "HPLC/UV analysis of proteins in dairy products using a hydrophobic interaction chromatographic column", *Analytical Sci.*, 17.
- Fiat, A.-M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C.B.D. e Caen, J., (1993), "Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities", *J. Dairy Sci.*, 76, 1, pp. 301-310.
- Fox, P.F., (1989a), "The milk protein system", em Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 1, pp. 1-54.
- Fox, P.F., (1989b), "Proteolysis during cheese manufacture and ripening", *J. Dairy Sci.*, 72, 6, pp. 1379-1400.
- Fox, P.F., O'Connor, T.P. e McSweeney, P.L.H., (1996), "Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects", *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 39, pp. 209-232.

- Fox, P.F. e MacSweeney, P.L.H., (1998), "Milk proteins", em Dairy Chemistry and Biochenistry", Blackie Academic & Professional, London, 1ª edição, Capítulo 4, pp. 146-238.
- Funtenberger, S., Dumay, E. e Cheftel, J.C., (1997), "High pressure promotes β-lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions", *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3, pp. 912-921.
- Furtado, M.M., (1983), "Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis", *J. Dairy Sci.*, 66, 9, pp. 1822-1824.
- Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A., Giuffrida, M.G., Galli, C.L. e Restani, P., (2000), "Proteolysis of α_s-casein as a marker of Grana Padano cheese ripening", *J.Dairy Sci.*, 83, 12, pp. 2733-2739.
- García, T., Martín, R., Rodríguez, E., Morales, P., Hernández, P.E. e Sanz, B., (1990), "Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay", *J. Dairy Sci.*, 73, 6, pp. 1489-1493.
- García, T., Martín, R., Rodríguez, E., Azcona, J.I., Sanz, B. e Hernández, P.E., (1991), "Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", *J. Food Prot.*, 54, 5, pp. 366-369.
- Ginger, M.R. e Grigor, M.R., (1999), "Comparative aspects of milk caseins", *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part B 124, pp. 133-145.
- Grappin, R.; Rank, T.C. e Olson, N.F., (1985), "Primary Proteolysis of cheese proteins during ripening. A review", *J. Dairy Sci.*, 68, 3, pp. 531-540.
- Grappin, R. e Horwitz W., (1988), "Determination of nitrogen content in milk by the kjeldahl method using copper sulfate: interlaboratory study", *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 71, 5, pp. 893-898.
- Grappin, R. e Ribadeau-Dumas, B., (1992), "Analytical methods for milk proteins", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 1, pp. 1-62.
- Guillou, H., Pelissier, J.P. e Grappin, R., (1986), "Méthodes de dosage des protéines du lait de vache", *Le Lait*, 66, pp. 143-175.

- Gupta, B.B., (1983), "Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion chromatography", *J. Chromatogr.*, 282, pp. 463-475.
- Haileselassie, S.S., Lee, B.H. e Gibbs, B.F., (1999), "Purification and identification of potencially bioactive peptides from enzyme-modified cheese", *J. Dairy Sci.*, 82, 8, pp. 1612-1617.
- Hambraeus, L., (1992), "Nutritional aspects of milk proteins", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 11, pp. 457-490.
- Haza, A.I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., González, I., Rodríguez, E., Sanz, B. e Hernández, P.E., (1996), "Development of monoclonal antibodies against caprine α_{s2}-casein and their potential for detecting the substitution of ovine milk by caprine milk by an indirect ELISA", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 7, pp. 1756-1761.
- Herraiz, T., Casal, V. e Polo, M.C., (1994), "Reversed-phase HPLC analysis of peptides in standard and dairy samples using on-line absorbance and post-column OPA-fluorescence detection", *Z Lebensm Unters Forsch*, 199, pp. 265-269.
- Hollar, C.M., Law, A.J.R., Dalgleish, D.G., Medrano, J.F. e Brown, R.J., (1991), "Separation of β-casein A^1, A^2, and B using cation-exchange fast protein liquid chromatography", *J. Dairy Sci.*, 74, 10, pp. 3308-3313.
- Huber, L., (1998), "Validation of analytical methods: review and strategy", *LC, GC International*, Fevereiro, pp. 96-105.
- Izco, J.M., Ordóñez, A.I., Torre, P. e Barcina, Y., (1999), "Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein", *J. Chromatogr. A*, 832, pp. 239-246.
- James, C.S., (1995), "Principles of techniques used in food analysis", Analytical chemistry of foods, Blackie Academic & Professional, Reino Unido, Capítulo 3, pp. 18-35.
- Jenness, R., (1980), "Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979", *J. Dairy Sci.*, 63, 10, pp. 1605-1630.

- Jin, Y.K. e Park, Y.W., (1995), "Effects of aging time and temperature on proteolysis of commercial goat milk cheeses produced", *J. Dairy Sci.*, 78, 12, pp. 2598-2608.
- Jin, Y.K. e Park, Y.W., (1996), "SDS-PAGE of proteins in goat milk cheeses ripened under different conditions", *J. Food Sci.*, 61, 3, pp. 490-494.
- Jong, N. de, Visser, S. e Olieman, C., (1993), "Determination of milk proteins by capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 652, pp. 207-213.
- Kalantzopoulos, G.C., (1999), "Cheeses from ewes' and goats' milk", em P.F. Fox (editor), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, 2ª edição, Capítulo 16, pp. 507-553.
- Kaminarides, S. E. e Anifantakis, E. M., (1993) "Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC", *J. Dairy Res.*, 60, pp. 495-504.
- Kaminogawa, S., Yan, T.R., Azuma, N. e Yamauchi, K., (1986), "Identification of low molecular weight peptides in Gouda-type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-terminal residues of α_{s1}-casein by protenases of *Streptococcus cremoris H61*", *J. Food Sci.*, 51, 5, pp. 1253-1256.
- Kemp, G., (1998), "Capillary electrophoresis: a versatile family of analytical techniques", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27, pp. 9-17.
- Kester, J.J., e Richardson, T., (1984), "Modification of whey proteins to improve functionality, *J. Dairy Sci.*, 67, 11, pp. 2757-2774.
- Kim, H.-H.Y. e Jimenez-Flores, R., (1994), "Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis", *J. Dairy Sic.*, 77, 8, pp. 2177-2190.
- Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., Brady, J. e Bringe, N.A., (1989), "Milk proteins: possible relationships of structure and function", em P.F. Fox (editor), Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 2, pp. 55-96.

- Lau, K.Y., Barbano, D.M. e Rasmussen, R.R., (1991), "Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in *Cheddar* cheese during aging", *J. Dairy Sci.*, 74, 3, pp. 727-740.
- Léonil, J. e Mollé, D., (1991), "A method for determination of macropeptide by cation-exchange fast protein liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk", *J. Dairy Res.*, 58, pp. 321-328.
- Léonil, J., Gagnaire, V., Mollé, D., Pezennec, S. e Bouhallab, S., (2000), "Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides", *J. Chromatogr. A*, 881, pp. 1-21.
- Li-Chan, E., Kwan, L., Nakai, S. e Amantea, G.F., (1992), "Silica-based and polymeric columns for reversed-phase HPLC analysis of *Cheddar* cheese", *J. Food Sci.*, 57, 2, pp. 350-354.
- López-Fandiño, R., Olano, A., Corzo, N. e Ramos, M., (1993), "Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk", *J. Dairy Res.*, 60, pp. 339-347.
- Mabon, R.M. e Brechany, E.Y., (1982), "Measurement of protein in fresh and stored goat's milk by a dye-binding technique", *Laboratory Practice*, 31(1), pp. 26-27.
- Malcata, F.X. e Macedo, A.C., (1994), "Lacticínios tradicionais e inovações tecnológicas", *Via Lactea*, nº 5, Julho, pp. 62-65.
- Manji, B., Hill, A., Kakuda, Y. e Irvime, D.M., (1985), "Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography", *J. Dairy Sci.*, 68, 12, pp. 3176-3179.
- Marcos, A., Esteban, M.A., León, F. e Fernandez-Salguero, J., (1979), "Electrophoretic patterns of european cheeses: comparison and quantitation", *J. Dairy Sci.*, 62, 6, pp. 892-900.
- Martins, A.P.L., Vasconcelos, M.M.P. e Rolo, M., (2000), "As denominações de origem protegidas de queijos portugueses - O mercado, o crescimento sectorial e as limitações estruturais e tecnológicas", *Via Lactea*, nº 15, Janeiro, pp. 25-33.
- Mayer, H.K., Heidler, D. e Rockenbauer, C., (1997), "Determination of the precentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and

cation-exchange HPLC of γ- and *para*-κ-caseins", *Int. Dairy Journal*, 7, pp. 619-628.

- Mayer, W. e Hörtner, H., (1992), "Discontinuous electrophoresis of β-caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products", *Electrophoresis*, 13, pp. 803-804.
- Mayer, W. e Hörtner, H., (1995), "Improved electrophoretic separation of β-caseins for the determination of bovine caseins in dairy products", *Proceedings of the Eight European Conference on Food Chemistry*, 2, pp. 438-441.
- McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F. e Healy, Á., (1994), "Proteolysis of bovine α_{s2}-casein by chymosin", *Z Lebensm Unters Forsch*, 199, pp. 429-432.
- Meisel, H., (1995), "Application of fourh derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein", *Milchwissenschaft*, 50, 5, pp. 247-251.
- Meisel, H. e Schlimme, E., (1996), "Bioactive peptides derived from milk proteins: ingredients for functional foods?", *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 48, pp. 343-357.
- Mendes, E., Faria, M.A.P., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O. e Ferreira, M.A., (1999a), "Detection of cow's milk in heated and fermented ewe dairy products by the polymerase chain reaction", 9as Jornadas de Analisis Instrumental, Barcelona, Livro de resumos, pp 94.
- Mendes, E., Faria, M.A.P., Ferreira, I.M.P.L.V.O. e Ferreira, M.A., (1999b), "Detecção da adulteração do leite e do queijo de ovelha com leite de vaca recorrendo à técnica de PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase)", 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, Livro de actas, pp 395-397.
- Mendia, C., Ibañez, F.C., Torre, P. e Barcina, Y., (2000), "Influence of the season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal cheese", *J. Dairy Sci.*, 83, 9, pp., 1899-1904.
- Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A. e Zerfiridis, G.K., (1998), "Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese", *J. Dairy Sci.*, 81, 12, pp. 3109-3116.

- Miller, J.N., (1991), "Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review, *Analyst*, 116, pp. 3-14.
- Miralles, B., Ramos, M. e Amigo, L., (2000), "Application of capillary electrophoresis to the characterization of processed cheeses", *J. Dairy Res.*, 67, pp. 91-100.
- Molina, E., Frutos, M. e Ramos, M., (2000), "Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks", *J. Dairy Res.*, 67, pp. 209-216.
- Mora-Gutierrez, A., Kumosinski, T.F. e Farrell Jr.., H.M., (1991), "Quantification of α_{s1}-casein in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds using reversed-phase high performance liquid chromatography", *J. Dairy Sci.*, 74, 10, pp. 3303-3307.
- Morrissey, J.H., (1981), "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity", *Anal. Biochem.*, 117, pp. 307-310.
- Morr, C.V., (1985), "Funcionality of heated milk proteins in dairy and related foods", *J. Dairy Sci.*, 68, 10, pp. 2773-2781.
- Morr, C.V., (1989), "Whey proteins: manufacture", em P.F. Fox (editor), Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 6, pp. 245-284.
- Mulvihill, D.M. e Fox, P.F. (1989), "Physico-chemical and functional properties of milk proteins", em P.F. Fox (editor), Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 4, pp. 131-172.
- Mulvihill, D.M., (1992), "Production, functional properties and utilization of milk protein products", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 9, pp. 369-404.
- Nakai, S. e Li-Chan, E., (1989), "Chemical and Enzymatic modification of milk proteins", em P.F. Fox (editor), Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 9, pp. 347-376.

- Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. e Monardes, H.G., (1982), "Environmental influences on protein content and compostion of bovine milk", *J. Dairy Sci.*, 65, pp. 1993-1998.
- Ng-Kwai-Hang, K.F. e Grosclaud, F., (1992), "Genetic polymorphism of milk proteins", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 10, pp. 405-456.
- Nielsen, P. e Waagner, E., (1988), "Technical treatment of milk", em H.R. Cross e A.J. Overby (editor), World Animal Science B3 - Disciplinary approach - Meat science, milk, science and technology, Elsevier Science Publishers B.V., Amesterdão, Capítulo 8, pp. 211-273.
- Parris, N., White, A.E., e Farrel Jr., H.M., (1990), "Identification of altered proteins in nonfat dry milk powder prepared from heat-treated skim milk", *J. Agric. Food Chem.*, 38, pp. 824-829.
- Parris, N. e Baginski, M.A., (1991), "A rapid method for the determination of whey protein denaturation", *J. Dairy Sci.*, 74, 1, pp. 58-64.
- Pavia, M., Trujillo, A.J., Gusmis, B. e Ferragut, V., (2000), "Proteolysis in Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation", *J. Dairy Sci.*, 83, 7, pp. 1441-1447.
- Pham, A.-M. e Nakai, S., (1984), "Application of setpwise discriminant analysis to high pressure liquid chromatography profiles of water extract for judjing ripening of *Cheddar* cheese", *J.Dairy Sci.*, 67, 7, pp. 1390-1396.
- Plath, A., Krause, I. e Einspanier, R, (1997), "Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques" *Z. Lebensm Unters Forsch A.*, 205, pp. 437-441.
- Prazeres, P.M., (1995), "Cromatografia de proteínas em biotecnologia", Soc. Portuguesa de Bioquímica, *Boletim de Biotecnologia*, 52, pp. 15-24.
- Ramos, M. e Juárez, M., (1986), "Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from differents species", *Bulletin International Dairy Federation*, 202, pp. 175-187.
- Rank, T.C., Grappin, R. e Olson, N.F., (1985), "Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review", *J. Dairy Sci.*, 68, 4, pp. 801-805.

- Raynal, K. e Remeuf, F., (2000), " Effect of storage at 4ºC on the physicochemical and rennetting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks", *J. Dairy Res.*, 67, pp. 199-207.
- Recio, I. e Olieman, C., (1996), "Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis"; *Electrophoresis*, 17, pp. 1228-1233.
- Recio, I., Frutos, M. de, Olan, A. e Ramos, M., (1996), "Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 12, pp. 3955-3959.
- Recio, I., Amigo, L. e López-Fandiño, R., (1997), "Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins", *J. Chromatogr. B*, 697, pp. 231-242.
- Richter, W., Krause, I., Graf, C., Sperrer, I., Schwarzer, C. e Klostermeyer, H., (1997), "An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ-caseins", *Z Lebensm Unters Forsch A*, 204, pp. 21-26.
- Rodríguez-Otero, J.L., Hermida, M. e Cepeda, A., (1995), "Determination of fat, protein, and total solids in cheese by near-infrared reflectance spectroscopy", *J. AOAC Int.*, 78, 3, pp. 802-806.
- Rodríguez-Otero, J.L. e Hermida, M., (1996), "Analysis of fermented milk products by near-infrared reflectance spectroscopy", *J. AOAC Int.*, 79, 3, pp. 817-821.
- Rollema, H.S., (1992), "Casein association and micelle formation", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 3, pp. 111-140.
- Ruiz, A.,G, e Redondo, L.C., (1995), "Estudio de las diferencias entre la elaboración artesanal e industrial de quesos manchegos acogidos a la denominación de origem", *Alimentacion, Equipos e Tecnología*, Julho/Agosto, pp. 43-48.

- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T., (2000), "Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese", *J. Dairy Sci.*, 83, 7, pp. 1434-1440.
- Salino, L., (1994), "Novos queijos regionais com denominação de origem", *Via Lactea*, nº5, Julho, pp. 67-69.
- Sannier, F., Bordenave, S. e Piot, J.M., (2000), "Purification of goat β-lactoglobulin from whey by an ultrafiltration membrane enzymic reactor", *J. Dairy Res.*, 67, pp. 43-51.
- Schlimme, E. e Meisel, H., (1995), "Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects", *Die Nahrung*, 39, 1, pp. 1-20.
- Shimazaki, K.-I- e Sukegawa, K., (1982), "Chromatographic profiles of bovine milk whey components by gel filtration on Fractogel TSK HW55F column", *J. Dairy Sci.*, 65, 11, pp. 2055-2062.
- Singh, H. e Creamer, L.K., (1992), "Heat stability of milk", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 15, pp. 621-656.
- Smithers, G.W., Ballard, F.J., Copeland, A.D., Silva, K.J. de, Dionysius, D.A., Francis, G.L., Goddard, C., Grieve, P.A., Mcintosh, G.H., Mitchell, I.R., Pearce, R.J. e Regester, G.O., (1996), "New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins", *J. Dairy Sci.*, 79, 8, pp. 1454-1459.
- Sousa, M.J. e Malcata, F.X., (1997), "Metodologia analítica para a monitorização da proteólise no queijo: princípios gerais e exemplos seleccionados", Soc. Portuguesa de Bioquímica, *Boletim de Biotecnologia*, 58, pp. 30-36.
- Southward, C.R., (1989), "Uses of casein and caseinates", em P.F. Fox (editor), Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 5, pp. 173-244.
- Splitt, H., Mackenstedt, I. e Freitag, R., (1996), "Preparative membrane adsorber chromatography for isolation of cow milk components", *J. Chromatogr. A*, 729, pp. 87-97.

- Strange, E.D., Van Hekken, D. e Thompson, M.P., (1991), "Qualitative and quantitative determination of caseins with reverse-phase and anion-exchange HPLC", *J. Food Sci.*, 56, 5, pp. 1415-1420.
- Strange, E.D., Malin, E.L., Van Hekken, D.L. e Basch, J.J., (1992), "Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins", *J. Chromatogr.*, 624, pp. 81-102.
- Swaisgood, H.E., (1992), "Chemistry of the caseins", em P.F. Fox (editor), Advanced dairy chemistry - 1: Proteins, Blackie Academic & Professional, Londres, 2ª edição, Capítulo 2, pp. 63-110.
- Swaisgood, H.E., (1993), "Symposium: genetic perspectives on milk proteins: comparative studies and nomenclature – Review and update of casein chemistry, *J. Dairy Sci.*, 76, 10, pp. 3054-3061.
- Tieleman, A.E. e Warthesen, J.J., (1991), "Comparison of three extraction procedures to characterize *Cheddar* cheese proteolysis", *J. Dairy Sci.*, 74, 11, pp. 3686-3694.
- Trujillo, A.J., Guamis, B. e Carretero, C., (1997), "Hydrolysis of caprine β-casein by plasmin", *J. Dairy Sci.*, 80, 10, pp. 2258-2263.
- Trujillo, A.J., Casais, I. e Guamis, B., (2000a), "Analysis of major ovine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 870, pp. 371-380.
- Trujillo, A.J., Casais, I. e Guamis, B., (2000b), "Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry", *J. Dairy Sci.*, 83, 1, pp. 11-19.
- Urbanke, W., Luf, W. e Brandl, E., (1992), "Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species", *Z Lebensm Unters Forsch*, 195, pp. 137-142.
- van Hekken, D.L. e Thompson, M.P., (1992), "Application of PhastSystem® to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis", *J. Dairy Sic.*, 75, 5, pp. 1204-1210.

- Vaz, M.C.V.F., (1999), "Desenvolvimento de sistemas automáticos de fluxo contínuo dedicado à análise de produtos lácteos", Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Vicent, A.M., (1990), Manual de Industrias Lacteas, Alfa-Laval, Madrid.
- Visser, S., Slangen, C.J. e Rollema, H.S., (1991), "Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 548, pp. 361-370.
- Visser, S., Slangen, C.J., Lagerwerf, F.M., Dongen, W.D.V. e Haverkamp, J., (1995), "Identification of a new genetic variant of β-casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis", *J. Chromatogr. A*, 711, pp. 141-150.
- Voirin, A., Letavernier J.-F. e Sebille, B., (1991), "Improvement of extraction and concentration of milk peptides with solid-phase cartridges for analysis by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 553, pp. 155-164.
- Walstra, P. e Jenness, R., (1984), "Protein composition of milk", em P. Walstra e R. Jenness (editores), Dairy Chemistry and Physics, Wiley, Nova Iorque.
- Wit, J.N. de, (1989), "Funcional properties of whey proteins", in P.F. Fox (editor), Developments in dairy chemistry - 4, Elsevier Applied Science, Londres, Capítulo 7, pp. 285-322.
- Wong, D.W.S., Camirand, W.M. e Pavlath, A.E., (1996) "Structure and functionalities of milk proteins", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 8, pp.807-844.

APÊNDICES

APÊNDICE A – SOLUÇÕES USADAS NA ELECTROFORESE

APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE HPLC

APÊNDICE C –CURVA DE CALIBRAÇÃO: CASEÍNA OVINA

APÊNDICE A

SOLUÇÕES USADAS NA ELECTROFORESE

Nos ensaios realizados na electroforese em gel de poliacrilamida com ureia prepararam-se diferentes soluções tampão: da amostra, do eléctrodo e dos géis de concentração e de corrida.

A.1. TAMPÃO DA AMOSTRA

O tampão da amostra (tris 0,12 M; ureia 8,2 M) foi preparado dissolvendo, num balão volumétrico de 50 ml, 0,75 g de tris; 24,5 g de ureia; 0,046 g de EDTA; ao que se adicionou 700 µl de β-mercaptoetanol e 250 µl de HCl. O pH foi ajustado a 6,8 com HCl, tendo-se adicionado azul de bromofenol como marcador, perfazendo-se o restante volume com água destilada.

A solução tampão foi armazenada a 8 ºC.

A.2. TAMPÃO DO ELÉCTRODO

O tampão do eléctrodo (tris 0,02 M; glicina 0,19 M) foi preparado dissolvendo, num balão volumétrico de 1000 ml, 3 g de tris e 14,6 g de glicina.

A solução tampão foi armazenada a 8 ºC.

A.3. TAMPÃO DO GEL DE CONCENTRAÇÃO

O tampão do gel de concentração (tris 0,06 M; ureia 4,5 M) foi preparado dissolvendo, num balão volumétrico de 100 ml, 0,755 g de tris; 27 g de ureia; ao que se adicionaram 400 µl de HCl. O pH foi ajustado a 7,6 com HCl perfazendo-se o restante volume com água destilada.

A solução tampão foi armazenada a 8 ºC.

A.4. TAMPÃO DO GEL DE CORRIDA

O tampão do gel de corrida (tris 0,76 M; ureia 9 M) foi preparado dissolvendo, num balão volumétrico de 250 ml, 23 g de tris; 135 g de ureia; ao que se adicionaram 2 ml de HCl. O pH foi ajustado a 8,9 com HCl perfazendo-se o restante volume com água destilada.

Esta solução foi armazenada à temperatura ambiente.

A.5. SOLUÇÃO DE ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA

Preparou-se ainda uma solução de 30% de acrilamida e 1,2% de bisacrilamida (p/v) em água destilada. Esta solução, depois de ser filtrada, foi protegida da luz e armazenada a 8 ºC.

A.6. COMPOSIÇÃO DO GEL

Na Tabela A.1. indicam-se os volumes das soluções utilizadas para a preparação dos géis de concentração e de corrida.

Tabela A.1. – Composição dos géis de concentração e de corrida.

Soluções	Gel de concentração 4% (µl)	Gel de corrida 10% (µl)
Acrilamida/bisacrilamida (30:1,2)	800	5000
Tampão do gel de concentração	4700	------
Tampão do gel de corrida	------	7300
TEMED	20	50
Persulfato de amónio 10% (p/v)[i]	80	150
Água destilada	400	2500
Volume total	6000	15000

i: solução preparada de fresco para cada utilização

APÊNDICE B

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE HPLC

Neste apêndice apresentam-se, sob a forma de tabelas, os valores das áreas dos picos cromatográficos obtidos nos ensaios realizados para a validação do método de HPLC em fase reversa para a caseína bovina: repetibilidade e reprodutibilidade do HPLC e do método, linearidade e curva de calibração e exactidão do método. Pretende-se, com esta informação adicional, contribuir para uma melhor e mais pormenorizada percepção do trabalho efectuado.

B.1. REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO HPLC

Nas tabelas B.1. e B.2. apresentam-se os valores das áreas e tempos de retenção utilizados no estudo da repetibilidade e a reprodutibilidade da técnica de HPLC, respectivamente. Indicam-se ainda os valores médios, desvio padrões e coeficientes de variação das áreas e dos tempos de retenção calculados para a caseína inteira bovina, α, β e κ-caseínas.

Tabela B.1. – Ensaios de repetibilidade da técnica de HPLC: áreas e tempos de retenção para seis injecções consecutivas de uma solução padrão de caseína inteira bovina de concentração 1,5 mg/ml.

Injecção	Área				Tempo de retenção (min)		
	α-caseína	β-caseína	κ-caseína	caseína inteira	κ-caseína	α-caseína	β-caseína
1ª	2883608	2109250	463847	5456705	14,81	18,68	22,79
2ª	2790908	2083845	492338	5367091	14,83	18,70	22,93
3ª	2754805	2144241	506474	5405520	15,18	18,96	23,01
4ª	2927720	2096603	477969	5502292	14,85	18,75	22,99
5ª	2832930	2169877	490710	5493517	14,97	18,91	23,04
6ª	2905048	2271351	492408	5668807	15,00	18,89	22,97
Média	2849170	2145861	487291	5482322	14,94	18,82	22,96
d.p.	67884	69195	14614	105008	0,14	0,12	0,09
CV (%)	2,38	3,22	3,00	1,92	0,94	0,63	0,39

Tabela B.2. – Ensaios de reprodutibilidade da técnica de HPLC: áreas e tempos de retenção para dezoito injecções em três dias diferentes, de uma solução padrão de caseína inteira bovina de concentração 1,5 mg/ml.

Dia	Injecção	Área				Tempo de retenção (min)		
		α-caseína	β-caseína	κ-caseína	Caseína inteira	κ-caseína	α-caseína	β-caseína
1	1ª	2918116	2196351	494395	5608862	15,16	19,01	23,11
	2ª	2934443	2361902	520263	5816608	14,84	18,63	22,91
	3ª	2944106	2384274	500645	5829025	15,01	10,03	23,01
	4ª	3027636	2421289	529353	5978278	14,79	18,64	22,91
	5ª	3055826	2575735	540860	6172521	14,87	18,69	23,02
	6ª	3100382	2572049	527836	6200267	15,00	18,99	23,02
2	1ª	2883608	2109250	463847	5456705	14,81	18,68	22,79
	2ª	2790908	2083845	492338	5367091	14,83	18,70	22,93
	3ª	2754805	2144241	506474	5405520	15,18	18,96	23,01
	4ª	2927720	2096603	477969	5502292	14,85	18,75	22,99
	5ª	2832930	2169877	490710	5493517	14,97	18,91	23,04
	6ª	2905048	2271351	492408	5668807	15,00	18,89	22,97
3	1ª	2783768	2001210	446173	5231151	14,77	1846	22,63
	2ª	3109620	2325240	471566	5906426	15,04	18,73	22,79
	3ª	2827194	2070076	457083	5354353	14,77	18,31	22,16
	4ª	2822191	2137352	422171	5381714	14,83	18,46	22,37
	5ª	2768623	2106127	457131	5331881	14,86	18,61	22,71
	6ª	2892114	2249899	450035	5592048	14,96	18,70	22,77
Média		2904397	2236593	485625	5627615	14,92	18,73	22,84
d.p.		110757	170146	32544	293561	0,13	0,20	0,25
CV (%)		3,81	7,60	6,70	5,22	0,85	1,09	1,09

B.2. PRECISÃO DO MÉTODO

As Tabelas B.3. e B.4. contêm os valores das áreas e dos tempos de retenção obtidos no estudo da precisão do método, respectivamente para a repetibilidade e reprodutibilidade do mesmo.

Os valores médios, desvios padrões e coeficientes de variação das áreas e dos tempos de retenção, determinados neste trabalho para a caseína inteira bovina, α, β e κ-caseínas são igualmente indicados.

Tabela B.3. – Ensaios de repetibilidade do método: áreas e tempos de retenção para os picos resultantes da análise, no mesmo dia, de seis alíquotas da mesma amostra de leite de vaca.

Alíquota	Injecção	Área				Tempo de retenção (min)		
		α-caseína	β-caseína	κ-caseína	Caseína inteira	κ-caseína	α-caseína	β-caseína
1	1ª	2805426	2003452	636224	5445102	14,74	18,60	21,79
	2ª	2700074	1991287	633281	5324642	14,78	18,54	21,68
	3ª	2698592	2034257	620640	5353489	14,79	18,53	21,61
2	1ª	2700851	2081173	642522	5424546	15,01	18,74	21,83
	2ª	2775215	2096508	639338	5511061	14,79	18,58	21,74
3	1ª	2700198	2010898	659346	5370442	14,80	18,59	21,71
	2ª	2651170	2110587	662439	5424196	14,80	18,61	21,76
	3ª	2750285	2057454	671246	5478985	14,82	18,65	21,86
4	1ª	2660404	1952720	629197	5242321	14,78	18,48	21,46
	2ª	2623211	1996333	601417	5220961	15,04	18,61	21,50
	3ª	2668040	2005625	611932	5285597	14,86	18,64	21,65
5	1ª	2685715	2085091	609987	5380793	14,80	18,56	21,59
	2ª	2690545	2048755	591434	5330734	14,77	18,51	21,58
	3ª	2756772	2068891	616901	5442564	14,76	18,49	21,55
6	1ª	2818495	2139497	616127	5574119	14,75	18,44	21,43
	2ª	2821654	2136594	604980	5563228	14,74	18,43	21,44
Média		2719165	2051195	627938	5398299	14,82	18,56	21,64
d.p.		61457	55160	23021	104693	0,09	0,08	0,14
CV (%)		2,26	2,69	3,67	1,94	0,58	0,44	0,64

Tabela B.4. – Ensaios de reprodutibilidade do método: áreas e tempos de retenção para os picos resultantes da análise, em dias diferentes, de doze alíquotas da mesma amostra de leite de vaca.

Dia	Alíquota	Injecção	Área				Tempo de retenção (min)		
			α-caseína	β-caseína	κ-caseína	Caseína inteira	κ-caseína	α-caseína	β-caseína
1	1	1ª	2910312	2019168	639654	5569134	14,77	18,52	21,64
		2ª	2896031	2065580	639785	5601396	14,82	18,57	21,64
		3ª	2950593	2127087	669026	5746706	14,81	18,57	21,64
	2	1ª	2757307	1830005	635495	5222807	14,99	18,71	21,83
		2ª	2719684	1864533	625368	5209585	15,03	18,73	21,86
		3ª	2807241	2021557	644684	5473482	15,07	18,68	21,74
	3	1ª	2876728	2002149	630803	5509680	14,82	18,55	21,59
		2ª	2839364	2010545	618952	5468861	14,85	18,56	21,58
		3ª	2947315	2065002	620530	5632847	14,90	18,56	21,49
	4	1ª	2693781	1860643	630684	5185108	15,02	18,65	21,65
		2ª	2635645	1856605	629733	5121983	14,77	18,50	21,55
		3ª	2704912	1927404	650386	5282702	14.87	18,60	21,64
	5	1ª	2883430	2074533	641869	5599832	14,96	18,64	21,67
		2ª	2912077	2075031	644706	5631814	14,95	18,64	21,70
		3ª	2988275	2119054	671640	5778969	14,81	18,55	21,63
	6	1ª	2944479	2056008	649237	5649724	14,85	18,61	21,67
		2ª	3082886	2171838	727502	5982226	14,83	18,84	21,60
		3ª	3058724	2076071	697669	5832464	14,77	18,49	21,55
2	7	1ª	2805426	2003452	636224	5445102	14,74	18,60	21,79
		2ª	2700074	1991287	633281	5324642	14,78	18,54	21,68
		3ª	2698592	2034257	620640	5353489	14,79	18,53	21,61
	8	1ª	2700851	2081173	642522	5424546	15,01	18,74	21,83
		2ª	2775215	2096508	639338	5511061	14,79	18,58	21,74
	9	1ª	2700198	2010898	659346	5370442	14,80	18,59	21,71
		2ª	2651170	2110587	662439	5424196	14,80	18,61	21,76
		3ª	2750285	2057454	671246	5478985	14,82	18,65	21,86
	10	1ª	2660404	1952720	629197	5242321	14,78	18,48	21,46
		2ª	2623211	1996333	601417	5220961	15,04	18,61	21,50
		3ª	2668040	2005625	611932	5285597	14,86	18,64	21,65
	11	1ª	2685715	2085091	609987	5380793	14,80	18,56	21,59
		2ª	2690545	2048755	591434	5330734	14,77	18,51	21,58
		3ª	2756772	2068891	616901	5442564	14,76	18,49	21,55
	12	1ª	2818495	2139497	616127	5574119	14,75	18,44	21,43
		2ª	2821654	2136594	604980	5563228	14,74	18,43	21,44
Média			2797513	2030645	638669	5466826	14,85	18,58	21,64
d.p.			124641	84850	27313	199159	0,10	0,08	0,11
CV (%)			4,46	4,18	4,28	3,64	0,65	0,41	0,53

B.3. LINEARIDADE E CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA A CASEÍNA BOVINA

As curvas de calibração para a caseína inteira bovina e respectivas fracções (α, β e κ-caseínas) foram determinadas pelo método dos mínimos quadrados (regressão linear).

Atendendo a que as referidas curvas de calibração foram calculadas com base em valores médios das áreas, apresentam-se ainda esses valores bem como os respectivos desvios padrões e coeficientes de variação. Convém realçar que, os valores indicados na Tabela 3.4. do capítulo 3, secção 3.2.1., foram calculados utilizando valores não arredondados de concentrações e áreas médias.

Nas Tabelas B.5. a B.8. podem observar-se os referidos dados experimentais para a caseína inteira, α, β e κ-caseínas bovinas, respectivamente.

Tabela B.5. – Caseína inteira bovina: valores utilizados para a curva de calibração.

Caseína inteira	Área					
(mg/ml) [i]	1ª injecção	2ª injecção	3ª injecção	média [i]	d.p.	CV (%)
0,377	2027331	2047101	2063222	2045885	17976	0,88
0,753	3433834	3292400	3448089	3391441	86068	2,54
1,130	4515406	4412248	4404911	4444188	61785	1,39
1,506	5816608	5829025	5978278	5874637	89970	1,53
2,259	8386624	8365004	8488320	8413316	65849	0,78
3,765	13362399	13534435	14053566	13650133	359816	2,64

i: valores arredondados

Tabela B.6. – α-caseína bovina: valores utilizados para a curva de calibração.

α-caseína	Área					
(mg/ml) [i]	1ª injecção	2ª injecção	3ª injecção	média [i]	d.p.	CV (%)
0,188	952915	980053	971439	968136	13867	1,43
0,377	1703812	1609294	1682033	1665046	49496	2,97
0,565	2297437	2234816	2209439	2247231	45294	2,02
0,753	2934443	2944106	3027636	2968728	51244	1,73
1,130	4508647	4213324	4346720	4356230	147891	3,39
1,883	6869377	6804894	7006043	6893438	102710	1,49

i: valores arredondados

Tabela B.7. – β-caseína bovina: valores utilizados para a curva de calibração.

β-caseína (mg/ml)[i]	Área					
	1ª injecção	2ª injecção	3ª injecção	média[i]	d.p.	CV (%)
0,151	919561	912048	920638	917416	4680	0,51
0,301	1456557	1405393	1482820	1448257	39375	2,72
0,452	1836004	1802059	1858235	1832099	28291	1,54
0,602	2361902	2384274	2421289	2389155	29993	1,26
0,904	3197455	3453932	3431223	3360870	141976	4,22
1,506	5400719	5668612	5890521	5653284	245260	4,34

i: valores arredondados

Tabela B.8. – κ-caseína bovina: valores utilizados para a curva de calibração.

κ-caseína[i] (mg/ml)	Área					
	1ª injecção	2ª injecção	3ª injecção	média[i]	d.p.	CV (%)
0,038	154855	155000	171145	160333	9363	5,84
0,075	273465	277713	283236	278138	4899	1,76
0,113	381965	375373	337237	364858	24147	6,62
0,151	520263	500645	529353	516754	14672	2,84
0,226	680522	697748	710377	696216	14986	2,15
0,377	1092303	1060929	1157002	1103411	48990	4,44

i: valores arredondados

B.4. EXACTIDÃO DO MÉTODO

Na Tabela B.9. apresentam-se os valores das áreas dos picos obtidos nos ensaios de exactidão do método, referentes à análise, em triplicado, de quatro alíquotas de uma mesma amostra de leite de vaca, uma sem adição de padrão e as restantes com adição de diferentes quantidades de padrão de caseína inteira bovina. É de referir que, a caseína precipitada a partir de cada alíquota foi dissolvida em 100 ml de solvente utilizado na preparação das amostras, tendo sido efectuadas as seguintes diluições: 1:1,5; 1:2; 1:2,5 e 1:2,5 para o ensaio sem adição de padrão, com adição de 57, 113 e 169 mg de padrão, respectivamente.

Tabela B.9. – Ensaios referentes à exactidão do método: áreas dos picos resultantes da análise, para quatro alíquotas da mesma amostra de leite de vaca sem e com adição de padrão de caseína inteira bovina.

Ensaios	Caseína	Área					
		1ª injecção	2ª injecção	3ª injecção	média	d.p.	CV (%)
Sem adição	α-caseína	3277016	3242355	3315408	3278260	36542	1,11
	β-caseína	2045644	2180993	2101584	2109407	68013	3,22
	κ-caseína	803838	796198	800415	800150	3827	0,48
	caseína inteira	6126498	6219546	6217407	6187817	53115	0,86
Adição 57 mg	α-caseína	2960448	2903031	3021701	2961727	59345	2,00
	β-caseína	2116787	2052561	2135513	2101620	43506	2,07
	κ-caseína	688202	690399	707555	695385	10596	1,52
	caseína inteira	5765437	5645991	5864769	5758732	109543	1,90
Adição 113 mg	α-caseína	2691338	2610576	2762785	2688233	76152	2,83
	β-caseína	1997022	1946719	1953516	1965752	27293	1,39
	κ-caseína	617654	626715	627202	623857	5377	0,86
	caseína inteira	5306014	5184010	5343503	5277842	83395	1,58
Adição 169 mg	α-caseína	3186967	3140636	3249387	3192330	54573	1,71
	β-caseína	2290455	2256423	2242197	2263025	24797	1,10
	κ-caseína	681649	664052	691408	679036	13864	2,04
	caseína inteira	6159071	6061111	6182992	6134391	65580	1,05

Os resultados apresentados na Tabela 3.6 do capítulo 3, secção 3.2.1., para as percentagens de recuperação do método foram calculados com base nos valores das massas de caseína determinados a partir respectivas curvas de calibração e das áreas apresentadas na tabela anterior. O cálculo dessas massas teve em atenção as diluições realizadas bem como o volume inicial da solução. Deste modo as percentagens de adulteração foram obtidas a partir da seguinte relação:

$$\text{Recuperação}\,(\%) = \frac{(\text{massa caseína})_{\text{com adição}}}{(\text{massa caseína})_{\text{sem adição}} + (\text{massa padrão adicionada})} \times 100 \qquad [B.1]$$

APÊNDICE C

CURVA DE CALIBRAÇÃO: CASEÍNA OVINA

Na Tabela C.1. indicam-se os valores das áreas obtidos nos ensaios de HPLC realizados, em triplicado, para diferentes concentrações de padrão de caseína inteira ovina. Estes valores foram utilizados para calcular, pelo método dos mínimos quadrados (regressão linear) a curva de calibração para a referida caseína.

Tabela C.1. – Caseína inteira ovina: valores utilizados para a curva de calibração.

Caseína inteira	**Área**					
(mg/ml) [i]	**1ª injecção**	**2ª injecção**	**3ª injecção**	**média**[i]	**d.p.**	**CV (%)**
0,431	1843561	1840430	---	1841996	2214	0,12
0,861	3029741	3042273	3032526	3034847	6580	0,22
1,292	4149617	4164919	4237581	4184036	46998	1,12
1,722	5671536	5693255	5607448	5657413	44613	0,79
2,583	7787975	7896657	8022792	7902475	117517	1,49
4,305	12028663	12762341	12303066	12364690	370701	3,00

i: valores arredondados

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA