

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE
ELETROFORESE EM GEL DE
POLIACRILAMIDA NA IDENTIFICAÇÃO DA
ADIÇÃO DE LEITE DE VACA AO LEITE DE
CABRA**

DANIELLE BRAGA CHELINI PEREIRA

2003

DANIELLE BRAGA CHELINI PEREIRA

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM
GEL DE POLIACRILAMIDA NA IDENTIFICAÇÃO DA
ADIÇÃO DE LEITE DE VACA AO LEITE DE CABRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Marco Antônio Moreira Furtado

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos
Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Danielle Braga Chelini

Utilização de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida na
identificação da adição de leite de vaca ao leite de cabra / Danielle Braga Chelini
Pereira. -- Lavras : UFLA, 2003.

124 p. : il.

Orientador: Marco Antônio Moreira Furtado
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Leite de cabra. 2. Eletroforese. 3. Fraude. 4. Urea-page. 5. Controle de
qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-664.07
-641.3714

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM
GEL DE POLIACRILAMIDA NA IDENTIFICAÇÃO DA
ADIÇÃO DE LEITE DE VACA AO LEITE DE CABRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do Curso de
Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência de
Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFPA

Profa. Dra. Edna Froeder Arcuri – EMBRAPA

**Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado
UFJF
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

Dedico este trabalho à minha avó materna, Sra. Augusta Paes Braga, para oferecer-lhe, na minha pessoa, um grau de instrução mais alto do que ela sonhava e a consciência da realidade que já não possui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente, mesmo que eu nem tenha tido tempo de pensar Nele.

À minha família, pais, avó, irmãos, sobrinhas, cunhadas, pelo apoio e carinho incondicionais.

Ao meu marido, Elimar, que esteve presente, cúmplice, companheiro e protetor, em todos os momentos e à minha filha, Marina, que ainda vai nascer e já tem horas de trabalho em laboratório e em frente ao computador.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao seu Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de aperfeiçoamento, e a seus professores e funcionários, pela dedicação e apoio.

Ao professor Marco Antônio Moreira Furtado, por ter misturado de forma muito produtiva amizade e orientação, pela disponibilidade e empenho neste trabalho, e pela paciência.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, também sempre participativo, fantástico nas dicas e sugestões, com quem foi muito gratificante poder trabalhar.

À professora Edna Froeder Arcuri que, desde o início, já contribuía e torcia ativamente por este trabalho, pela atenção, empenho e disponibilidade.

À professora Ana Helena Romaniello Coelho, pela cortesia e atenção.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, especialmente à Faculdade de Farmácia e Bioquímica, na pessoa do Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado, responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Alimentos, onde a parte experimental foi conduzida, e aos seus funcionários e colaboradores: as estagiárias Sandra, Aline e, destacadamente, Rosana, Ludmila e Maíra; Nádia, Maura, Randázio e Sebastião. Aos professores Lúcio, Beth e Miriam pelo

incentivo constante. Também à professora Eveline, do ICB/UFJF, que disponibilizou seu laboratório para o treinamento na técnica de eletroforese.

Ao Centro Tecnológico/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, da EPAMIG, especialmente nas pessoas de seu chefe, Dr. Geraldo Alvim Dusi, Secretário Executivo da SEPPA, Prof. José Alberto Bastos Portugal e da Profa. Regina Célia Mancini, Coordenadora de Ensino, por fazerem tudo o que estava ao seu alcance para favorecer o andamento deste projeto. Também aos colegas de trabalho, professores, funcionários e alunos, pelo apoio e confiança. Especialmente, às funcionárias do Laboratório de Controle de Qualidade, Eloá, Irani e Rosa, pela coleta paciente das amostras e ao Michael, que se esforçou sobremaneira para que este trabalho pudesse ser concluído; ao Helvécio, companheiro muito agradável nas viagens, à Silmat, sempre disponível quando era necessário e ao Fernando, que fez muitas viagens a Lavras em meu nome.

À EMBRAPA – Gado de Leite, nas pessoas do Coordenador do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal, Dr. Leônidas P. Passos, Maria Coletta Vidigal e Frederico Barros de Sousa, que permitiram o uso do densitômetro para avaliação dos resultados obtidos, mas, além disso, receberam-me com muita disponibilidade e consideração. Especialmente à amiga Coletta, que pode se considerar responsável pelo meu desempenho em eletroforese. Também ao Sr. José Renaldi Feitosa Brito, que me forneceu bronopol para as pesquisas e à Sra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito, que fez o contato com o Laboratório de Fisiologia Vegetal.

À Avantepharma do Brasil, nas pessoas de seu diretor, Sr. José Francisco Roll e de seu farmacêutico responsável, Sr. Elimar Silva de Souza, pelas doações que contribuíram para otimizar o trabalho em nosso laboratório.

Aos fornecedores das amostras, Sr. Jarbas da Costa Vidal e seu funcionário Zé Carlos, do restaurante Cantinho da Roça, em Tabuleiro, MG; Sr. Caetano Geraldo de Souza, extensivo à sua filha Joana (minha aluna) e seu

funcionário Sebastião, da Chácara Santa Clara, em Coronel Pacheco, MG; Sr. José Henrique Bruschi e sua esposa, Sra. Marlene Campos Mendes Bruschi, além do funcionário Batista, da Granja Água Limpa, em Piau, MG.

À amiga e companheira de gravidez, Luciana Oliveira de Fariña, pelos padrões de caseína bovina.

Ao amigo Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior, que acompanhou por mim toda a fase de revisão e impressão da dissertação, pelo apoio e disponibilidade.

Aos colegas e amigos Paulo Henrique e Eduardo, que tornaram possível enfrentar esse desafio e ainda mais uma vez ao Eduardo, pelo companheirismo e dedicação ao me acompanhar na defesa. Aos nossos amigos do peito, Ednéia, Afrânio, Giron e Humberto, com quem espero lanchar muitas vezes. A todos os outros colegas de UFLA, especialmente ao Prof. Gonçalves e ao Silvio.

A todos aqueles que materializaram de alguma forma a conspiração do universo a favor desta vitória, mesmo que, involuntariamente, não tenham sido citados.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Importância do leite de cabra no contexto atual.....	5
2.1.1 Rebanho e produção.....	5
2.1.2 Características da caprinocultura leiteira e mercado do leite de cabra.....	6
2.1.3 Valor alimentar e consumidores especiais.....	10
2.2 Controle de qualidade.....	16
2.2.1 Importância do controle de qualidade de leite de cabra.....	16
2.2.2 Fraude do leite de cabra por adição de leite de vaca.....	17
2.2.3 Métodos aplicáveis à detecção de mistura de leites de diferentes espécies.....	19
2.2.3.1 Xantina-oxidase.....	20
2.2.3.2 Gordura.....	21
2.2.3.3 Proteínas.....	23
2.2.4 Legislação brasileira.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Planejamento experimental.....	35
3.2 Local e instituições envolvidas.....	35
3.3 Primeira etapa.....	36
3.3.1 Amostras.....	36
3.3.2 Metodologia.....	39
3.3.2.1 Método native-PAGE.....	43
3.3.2.2 Método SDS-PAGE.....	47
3.3.2.3 Método UREA-PAGE.....	50
3.4 Segunda etapa.....	53
3.4.1 Amostras.....	53
3.4.2 Padrões utilizados.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Avaliação das variações analíticas da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	57
4.2 Avaliação do perfil eletroforético de amostras de leite de cabra e vaca pelo método UREA-PAGE.....	70
4.3 Avaliação de amostras de leite de cabra adicionadas de leite de vaca pela técnica UREA-PAGE.....	80
4.4 Influência da conservação de amostras com Bronopol® e a frio, e dos processamentos – térmico e desidratação – sobre os perfis eletroforéticos	

obtidos.....	87
4.4.1 Conservação das amostras com Bronopol ®.....	87
4.4.2 Conservação das amostras a frio.....	91
4.4.3 Processamento térmico e desidratação.....	95
5 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
ANEXOS.....	121

RESUMO

PEREIRA, Danielle Braga Chelini. **Utilização de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida na identificação da adição de leite de vaca ao leite de cabra.** Lavras: UFLA, 2003. 124p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*

O presente trabalho foi conduzido com o intuito de avaliar métodos eletroforéticos para detecção de fraudes pela adição de leite de vaca ao leite de cabra, incluindo sua aplicação na rotina dos laboratórios de análise de alimentos, definição das condições de amostragem e o preparo das amostras para análise. Os métodos avaliados foram técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (native-PAGE), desnaturantes (SDS-PAGE) e na presença de uréia (UREA-PAGE). As amostras analisadas eram provenientes da região de Juiz de Fora, MG e compreenderam leites individuais, provenientes de diferentes raças, diferentes propriedades produtoras e leite de conjunto, leites conservados com Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), leite cru, pasteurizado, UHT e em pó. Observou-se que a metodologia mais aplicável foi UREA-PAGE, uma vez que permitiu uma diferenciação mais clara entre os perfis dos leites genuínos das espécies pesquisadas, além da maior rapidez e menor número de etapas analíticas (fase de revelação). Não foram observadas diferenças entre amostras de leite cru com e sem adição do conservante Bronopol®. Adições de leite de vaca ao de cabra foram executadas nas proporções de 0,1% a 44,44%, tendo sido identificadas, por análise visual dos densitogramas obtidos, a partir de 4,76%. O método mostrou-se adequado à detecção de misturas e a determinação quantitativa pode ser testada por meio dos recursos da densitometria. Este trabalho espera contribuir para a indicação do parâmetro mais adequado à identificação de fraudes pela mistura de leite de vaca ao de cabra e da técnica analítica a empregar neste sentido, uma vez que as legislações pertinentes, em âmbito municipal, estadual ou federal, preconizam o controle desta adulteração, sem, contudo, definir a metodologia a ser empregada.

* Comitê Orientador: Marco Antônio Moreira Furtado (Orientador) – UFJF, Luiz Ronaldo de Abreu (Co-orientador) – UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Danielle Braga Chelini. **Detection of cow's milk and goat's milk mixtures by polyacrylamide gel electrophoresis techniques.** Lavras: UFLA, 2003. 124p. (Dissertation – Master Program in Food Science)*

This work evaluated electrophoretic techniques for detection of frauds of goat milk with addition of cow milk aiming to use the technique in the routine of the laboratories of food analysis. Also, it was defined the conditions of sampling and preparation of samples for analysis. The evaluated methods were techniques of polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions (native-PAGE), denaturing (SDS-PAGE) and with urea (UREA-PAGE). The milk samples were from the region of Juiz de Fora, MG and included individual milk from different races, different producing properties and bulk milk, milk conserved with Bronopol® (2-bromine-2-nitropropano-1,3-diol), raw milk, pasteurized, UHT and dry milk. It was observed that the methodology most applicable was UREA-PAGE, because it was faster and differentiated more clearly the profiles of genuine milk of the searched species. Differences between raw milk samples had not been observed with and without addition of the preservative Bronopol®. Additions of cow milk to goat milk were done at the ratios of 0.1% to 44.44%. Visual analysis of the densitograms identified a minimum 4.76% cow milk addition. The method revealed adequate to the detection of mixtures and the quantitative determination can be tested through the resources of densitometry. This work can contribute for the indication of the parameter to detect fraudulent addition of cow's milk to goat's milk and of the analytical technique to use in this direction, since that the pertinent regulations, in municipal, state or federal scope propose the control of this adulteration, without however defining the methodology to be used.

* Guidance Committee: Marco Antônio Moreira Furtado (Adviser) – UFJF, Luiz Ronaldo de Abreu– UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O valor nutritivo de um alimento é definido pela concentração, balanço e biodisponibilidade dos nutrientes fornecidos, e pela presença ou não de componentes tóxicos e/ou antinutricionais. Com relação ao leite, sua qualidade nutricional é amplamente conhecida e sua importância, bem como a dos derivados lácteos, na alimentação humana bastante destacada; é fonte de macro e micronutrientes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde, e constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e humanos de todas as idades.

Apesar da grande predominância da pecuária leiteira bovina e, conseqüentemente, de conhecimento científico sobre o leite de vaca, há que se destacar a utilização de leites provenientes de outras fêmeas mamíferas na alimentação humana, seja na forma fluida (*in natura*) ou como derivados (queijos, iogurte, entre outros), por razões diversas (comercial, nutricional, social, econômica, tecnológica, cultural e geográfica). O mercado atual preocupa-se em disponibilizar grande variedade de produtos adequados a interesses cada vez mais particulares dos consumidores, o que se observa também no setor lácteo, pela crescente oferta de produtos específicos para certos nichos de mercado. Os consumidores buscam produtos lácteos diferenciados, com padrão de qualidade e com apelo dos mais saudáveis.

Quanto ao leite de cabra, sua inserção na alimentação humana apresenta inúmeras vantagens, como o baixo teor de colesterol, alto valor protéico, alta digestibilidade e altos teores de ácidos graxos de cadeia curta. É recomendado, ainda, para pessoas idosas, doentes, convalescentes e crianças, e especialmente para indivíduos que apresentam alergia ao leite de vaca, reconhecida numa frequência de 0,3% a 7% em crianças, sobretudo nos primeiros anos de vida.

O leite de cabra (*Capra hircus*) foi introduzido na alimentação humana quando este animal foi domesticado por povos nômades da Ásia e do Oriente Médio, por volta de 8000 a.C. Os caprinos têm a mesma origem evolutiva dos bovinos (Guimarães, 1993; Fiesber et al., 1999; A CAPRICNOCULTURA, 2002).

Nos países em desenvolvimento, a caprinocultura e a produção de leite de cabra desempenham importante papel econômico-social, como fonte de proteína na alimentação e de renda para as famílias, viabilizando a pequena propriedade rural e promovendo a fixação do homem no campo, representando, freqüentemente, o animal de opção em programas sociais. Entretanto, os sistemas de produção variam desde criações de subsistência em pequenos criatórios nas áreas rurais ou periferias de grandes cidades, até criatórios comerciais bem organizados, com grande estrutura de produção e, na maioria das vezes, dedicando-se também ao beneficiamento e comercialização dos produtos.

O leite de cabra apresenta uma série de peculiaridades que o tornam, além de excelente opção do ponto de vista nutritivo, boa alternativa mercadológica, observando-se a crescente oferta de produtos de leite de cabra, disponibilizados comercialmente como diferenciados, e de trabalhos científicos avaliando as características e potencialidades deste alimento. A legislação federal, por meio da Instrução Normativa 37/2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, fixou recentemente as condições de produção, a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano.

Considerando esta crescente valorização do produto, que chega a atingir preços cinco vezes mais altos que os similares obtidos com leite de vaca, e a semelhança com relação à composição geral do leite destas espécies, pode-se prever a freqüente ocorrência de adulteração pela adição de leite de vaca ao leite

de cabra, corroborada ainda por outros fatores, como a sazonalidade, descentralização e pequena produção, características do leite de cabra. A ocorrência de adulteração de qualquer natureza implica, além de abuso contra a economia do consumidor, em danos significativos à saúde pública, contrariando o Código de Defesa do Consumidor (Prefeitura....., 1990) e a legislação vigente (Brasil, 2000). Esta constitui uma preocupação em vários países, apesar das legislações brasileiras não indicarem metodologias específicas a adotar para a detecção das misturas. O controle deste tipo de adulteração implica na disponibilidade de métodos analíticos seguros que permitam vigilância constante dos órgãos de fiscalização.

Dentre as metodologias disponíveis para identificação da mistura de leites de diferentes espécies, particularmente a adição de leite de vaca ao de cabra, destacam-se as que se baseiam na determinação da atividade enzimática (xantina-oxidase), e na identificação de diferenças nas frações protéicas e gordurosa, incluindo, nesta última, o teor de β -caroteno. Entre estas avaliações, aquelas que consideram as diferenças nas frações protéicas parecem ser as mais adequadas e podem ser executadas por diferentes processos analíticos, como os métodos imunológicos, eletroforéticos e cromatográficos.

O presente trabalho objetivou avaliar o emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), seguida de densitometria, com três variações metodológicas. São elas a avaliação das proteínas em seu estado nativo (native-PAGE), em condições desnaturantes (SDS-PAGE) ou em presença de uréia (UREA-PAGE) para a detecção desta adulteração, com base nas diferenças existentes na distribuição protéica, particularmente das frações caseínicas, entre os leites de cabra e vaca, bem como a definição da seqüência analítica a ser implementada, para rebanhos da região de Juiz de Fora, MG, avaliados durante o ano de 2002. Também foram avaliadas as diferenças entre amostras individuais de leite de cabra, raças caprinas e rebanhos bovinos e caprinos, e a influência das

condições de amostragem e da conservação a frio e dos processamentos sobre a metodologia escolhida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do leite de cabra no contexto atual

2.1.1 Rebanho e produção

Segundo dados da Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), a produção mundial de leite de cabra em 2002 foi de 12.696.556 toneladas (contra 11.824.241 toneladas em 1996, observando-se ligeiro acréscimo ano a ano) e o rebanho mundial é de 146.677.731 cabeças (era composto por 138.613.587 cabeças em 1996). A média de produção por animal totaliza 866 hectogramas. Em comparação com o leite de outras espécies mamíferas, os números demonstram que o rebanho caprino aparece em terceiro lugar, seguindo o bovino e o ovino. A mesma tendência é observada quanto ao rebanho destinado à produção de leite, composto por 146.677.731 animais (aproximadamente 24%), num total mundial de 606.380.210 cabeças; a produção de leite de cabra corresponde a 2% do somatório de 597.682.139 toneladas produzidas mundialmente, contadas as cinco principais espécies leiteiras. Portanto, apresenta-se em terceiro lugar, seguindo o leite bovino e o bubalino, e à frente em produção de ovelhas e camelas.

O Brasil, com uma produção de 138.000 toneladas, é o vigésimo maior produtor mundial de leite de cabra, embora possua o oitavo maior rebanho, com 4.600.000 cabeças em produção de leite. O rendimento da produção, em hectogramas por animal, é de 300, sendo o quinquagésimo quinto melhor do mundo. A produção em relação à população do país, no ano de 2002, foi de 0,79 toneladas de leite de cabra para cada 1.000 habitantes. Apesar do aumento no rebanho caprino nacional de 1996 a 2002, o número de cabeças em produção leiteira caiu ligeiramente, bem como a produção de leite.

O Brasil é o principal produtor de leite de cabra na América do Sul, contribuindo com cerca de 76% do total produzido (que é de 181.940 toneladas).

No Brasil, o rebanho bovino é seguido pelo ovino, com o caprino aparecendo em terceiro lugar. Mas, com relação à produção e número de cabeças em produção de leite, só estão disponíveis dados sobre os rebanhos bovino e caprino (BRASIL, 2003a; FAO, 2003).

Os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam, pelo Censo Agropecuário de 1995-1996, que a produção de leite de cabra no Brasil foi de 21,9 milhões de litros. A maior parte deste total é proveniente da região nordeste (cerca de 70% do total), da qual os estados da Bahia (com ampla vantagem), Pernambuco e Ceará são os maiores produtores. A região sudeste é a segunda em termos de produção de leite caprino, com cerca de 21% do total (4,63 milhões de litros), com destaque para o estado de Minas Gerais (2,06 milhões de litros ou 45% da produção, além do maior rebanho da região), seguido pelo estado de São Paulo. O rebanho caprino brasileiro, de 11.894.587 cabeças em 1990, manteve-se com pequena oscilação até 1995, apresentando queda expressiva no ano de 1996 e demonstrando discreta elevação desde então, atingindo 9.537.439 cabeças em 2001 (IBGE, 2003).

2.1.2 Características da caprinocultura leiteira e mercado do leite de cabra

A caprinocultura leiteira é recente no Brasil, com grande dispersão geográfica (Richards et al., 2001). O número de cabeças não reflete inteiramente a quantidade de leite produzida, uma vez que a criação de cabras é freqüentemente desenvolvida também para exploração de carne e couro.

Além disso, podem ser apontadas diferenças expressivas nesta atividade nas diversas regiões do país. O sudeste parece experimentar uma evolução mais rápida no setor, em razão da organização da cadeia produtiva, do processamento industrial e da garantia de comercialização do leite e seus derivados. Guimarães (1993) destaca que a região centro-sul tem desenvolvido tecnologias de produção de queijos e implantação de um mercado eficiente de leite *in natura*.

Embora concentre cerca de 90% do rebanho caprino nacional, o nordeste tem sido noticiado como uma região cuja produção leiteira e, principalmente, a contribuição no total de leite comercializado, têm sido bem menos representativas (Thomasi, 2002) e onde a caprinocultura (uma de suas principais atividades agrícolas) não se caracteriza como uma atividade comercial bem organizada. A criação de cabras vem sendo implementada e organizada como programa governamental na região, em função de representar uma boa alternativa de melhoria na nutrição das populações mais pobres e de diversificação das atividades rurais (Pereira Filho, 2001; Thomasi, 2002; Guarda & Carneiro, 2002). Por outro lado, o setor industrial já demonstra interesse em adquirir boa parte da produção (Pereira Filho, 2001; Thomasi, 2002; Guarda & Carneiro, 2002).

A produção de leite de cabra tem sido implementada como alternativa de desenvolvimento agropecuário e conseqüente fixação do homem no campo também na microrregião de Juiz de Fora (Almeida et al., 2001).

O potencial de demanda, mesmo considerando a clientela para o leite de cabra como um público diferenciado, é apontado por alguns autores como o dobro da produção atual (IBGE, citado por Thomasi, 2002; Costa, 2003) e os inúmeros produtos de leite de cabra são de grande aceitação no mercado, tanto nacional como internacional (Richards et al., 2001; Guarda & Carneiro, 2002; Carneiro, 2002).

A oferta de leite de cabra no mercado brasileiro chega a 6,1 milhões de litros de leite por ano. O mercado está subdividido em venda de leite fluido (93%), venda de leite em pó (4%) e venda de queijos, doces e iogurtes (3%). Apesar da expansão e da verticalização da caprinocultura, obstáculos importantes ao aumento no consumo de leite de cabra ainda estão por ser vencidos em relação aos consumidores, secularmente acostumados a utilizar a carne e o leite bovinos como alimentos básicos (Richards et al., 2001). Também

há carência de legislação sobre o tema (Hashimoto & Antunes, 1992), o que só mais recentemente vem sendo modificado.

Embora, na região sudeste, seja destacado o consumo leite de cabra UHT e em pó (Pereira Filho, 2001), a comercialização do leite de cabra fluido ainda ocorre de forma predominantemente clandestina, sem qualquer tipo de controle de qualidade. Esta situação pode ser atribuída também ao fato de existirem poucas opções no mercado de produtos industrializados por laticínios tradicionais, dadas a sazonalidade e descentralização da produção e o pequeno volume obtido, com produção por animal de cerca de 2,5 litros, em média (Gomes et al., 1997; Almeida et al., 2001). A produção de leite é, assim, insuficiente em quantidade e continuidade do fornecimento para atender à demanda da indústria laticinista, já que, devido às particularidades inerentes aos caprinos, a produção de leite é sazonal, apresentando assim períodos de safra e entressafra bem definidos durante o ano. A atividade industrial tem custo operacional alto para o beneficiamento da matéria-prima, exigindo para isto um volume maior de leite para uma escala de produção compatível com a rentabilidade do produto. Com o propósito de minimizar o problema da sazonalidade e diminuir os custos de produção, tem-se processado o leite no criatório por pasteurização lenta e congelado para estocagem (Guimarães, 1993). A produção de derivados pode ser considerada uma alternativa, visto a dilatação do prazo de validade do produto.

A grande importância industrial do leite de cabra está ligada à fabricação de queijos finos (Bonassi, 1987). Mas, vem se destacando uma crescente disponibilização no mercado de outros produtos industrializados, como leite pasteurizado, leite esterilizado, em pó e achocolatado (inclusive adicionados de vitaminas), iogurtes (Andrade et al., 1999) e produtos fermentados, doces (Laguna et al., 1998) e ricota (Medeiros et al., 2001). Associado a isso, vêm sendo realizados um número cada vez maior trabalhos

avaliando a qualidade, composição e aspectos tecnológicos dos produtos descritos, bem como a viabilidade de outros, como os probióticos e concentrados protéicos (Lampo & Caroppo, 1980; Ramos & Juarez, 1985; Hashimoto & Antunes, 1992; Rueda et al., 1992; Mayer et al., 1997; Andrade et al., 1999; Almeida et al., 2000; Laguna et al., 2000; Neves et al., 2000; Richards et al., 2001; Silva et al., 2001; Travassos et al., 2001; Silva et al., 2002). Alguns produtos praticamente ainda não apresentam referências da fabricação em escala industrial, como manteiga (em razão das dificuldades relacionadas à separação de creme e à cor muito branca pela carência de caroteno), leite evaporado e condensado, e sorvetes (Bonassi, 1987).

A elaboração quase sempre artesanal e as propriedades particulares do leite de cabra tornam seus produtos derivados, especialmente os queijos finos, diferenciados e muito valorizados comercialmente como produtos sofisticados. Dessa forma, há preocupação, particularmente nas regiões de produção tradicional (países europeus, como França, Itália e Portugal), em proteger a denominação do produto e restringir a região geográfica em que pode ser produzido e, conseqüentemente, seus ingredientes e etapas clássicas de fabricação. Busca-se, assim, evitar as alterações de suas características consagradas pela banalização e industrialização, especialmente se considerarmos a tendência da indústria atual de, em função do aumento da produtividade, tornar os produtos cada vez menos tradicionais (padronizados, processados, aromatizados, análogos) e adequados para uso como ingrediente em lugar da degustação direta. Isto torna de extrema importância a autenticidade destes queijos (Portugal in site: queijos, 2001; Seabra, 2003; Roteiro dos queijos de cabra, 2003)

2.1.3 Valor alimentar e consumidores especiais

O consumo de leite de cabra tem tido um aumento progressivo devido a seu elevado valor nutritivo, boa digestibilidade e, principalmente, indicações terapêuticas para indivíduos que apresentam alergia ao leite de vaca, em especial recém-nascidos e crianças. Segundo a Federação Internacional de Laticínios (FIL-IDF), em 1983, metade da população mundial estava consumindo leite de cabra, incluindo as classes de maior poder aquisitivo. Tem sido observado aumento na procura e no consumo do leite de cabra e seus derivados, principalmente queijos (Furtado & Wolfschoon-Pombo, 1978; Silva et al., 1993; Almeida et al., 2001). Segundo a FAO, o consumo mundial de leite de vaca está estabilizado, enquanto o de cabra subiu 6,1% em cinco anos (Cabra marcada para render, 1997).

A relação entre a quantidade de nutrientes fornecidos pelo leite de cabra e a quantidade requerida na alimentação de crianças é satisfatória quanto a proteínas, cálcio, fósforo, tiamina (vitamina B₁), riboflavina (B₂), pantotenato (B₅), retinol (vitamina A) e niacina (B₃). Entretanto, apresenta-se deficiente quanto a ferro, ácido ascórbico (vitamina C), calciferol (D), cobalamina (B₁₂), piridoxina (B₆) e folato (B₉). Tanto o leite de cabra quanto o de vaca são igualmente deficientes nas vitaminas C e D, devendo ser suplementados com concentrados para crianças. Os teores de vitamina A são superiores no leite de cabra e, além disso, as cabras convertem fisiologicamente todo o caroteno em vitamina A, conferindo ao leite a coloração esbranquiçada pela ausência deste pigmento (Fisberg et al., 1999). O leite de vaca contém mais piridoxina, folato e vitamina B₁₂ e satisfaz às necessidades infantis adequadamente, enquanto a carência dessas últimas no leite de cabra tem sido implicada na chamada anemia do leite de cabra.

Tem sido confirmado que o teor de folato do leite de cabra é muito mais baixo (cerca de 10 vezes) que o do leite de vaca ou humano. Detectou-se, no

leite de cabra, uma soroproteína que liga-se ao folato, apresentando-se na proporção de cerca de 12 µg/mL. Trata-se de uma glicoproteína com cerca de 22% de carboidrato, que pode ligar-se a 9,2 µg de ácido fólico por mg de proteína (Jenness, 1980; Bonassi, 1987). Um experimento demonstrou que a assimilação de cálcio por ratos foi ligeiramente maior a partir do leite de cabra do que do leite de vaca. A riqueza do leite de cabra em potássio e cloreto (cerca de uma vez e meia a mais que no leite de vaca, segundo Jaubert, 1992) tem sido apontada como desvantajosa nutricionalmente para crianças (Jenness, 1980).

Embora os leites caprino, bovino e humano apresentem variações quanto às proporções e tipos de proteínas presentes, a composição total em aminoácidos da mistura de proteínas é bastante similar, de forma que os três apresentam um balanço satisfatório de aminoácidos essenciais, igualando ou excedendo as quantidades requeridas para cada um deles (Jenness, 1980).

Alguns ácidos graxos, como o linoléico e o araquidônico, são essenciais à dieta humana, já que não são sintetizados no organismo. Um mínimo de 0,1% da quantidade total de energia ingerida deve ser proveniente destes ácidos. Tanto o leite de vaca quanto o de cabra apresentam concentrações adequadas destes ácidos para crianças, apesar da concentração ser levemente mais elevada na gordura do leite de algumas cabras. Em ambos, o ácido linoléico fornece cerca de 1% das calorias totais (Jenness, 1980).

Além de seu valor nutritivo, o leite de cabra apresenta outras características relevantes, como a hipoalergenicidade. De acordo com vários trabalhos, é reconhecida a existência de alergia ao leite de vaca em crianças, em uma frequência de 0,3% a 7,0 %, sobretudo nos primeiros anos de vida. As proteínas podem ser apontadas como fatores etiológicos, particularmente a caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina (Furtado, 1981).

Na maioria dos trabalhos, os pediatras afirmam que o leite de cabra pode ser usado como substituto para hipersensibilidade ao leite de vaca (Jenness,

1980; Park, 1993; Fisberg et al., 1999). Algumas particularidades deste leite podem elucidar o mecanismo pelo qual se obtém o controle da alergia. As proteínas do soro (α -lactalbumina e β -lactoglobulina) do leite de cabra são imunologicamente diferentes das do leite de vaca, apesar de alguns trabalhos demonstrarem que as cinco principais proteínas do leite de cabra (κ -caseína, β -caseína, α_{s2} -caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina) apresentam grande semelhança com suas homólogas no leite de vaca. O leite de cabra não apresenta um homólogo da α_{s1} -caseína, a mais abundante proteína do leite de vaca. A β -caseína é, quantitativamente, o principal componente do leite de cabra, representando 60% da proteína deste leite e apenas 30% da caseína do leite de vaca (Jenness, 1980). A caseína do leite de cabra contém mais glicina, menos arginina e menos aminoácidos sulfurados (principalmente metionina) do que a do leite de vaca (Maree, 1978, citado por Furtado, 1981), o que mostra que existem diferenças entre estas proteínas.

De fato, a seqüência dos resíduos de aminoácidos das proteínas está determinada geneticamente. As diferenças na seqüência de aminoácidos de uma proteína nas distintas espécies biológicas e inclusive na mesma espécie são conseqüência de mutações nos códons de DNA ocorridas ao longo do curso evolutivo (Walstra & Jenness, 1987).

Apesar de haver extensa reação imunológica cruzada às proteínas do leite de cabra e vaca, há casos de alergia ao leite de vaca que não foram suspensas pela substituição por leite de cabra, e enteropatia crônica que foi curada por esta substituição. Apesar da diferença no conteúdo de α_{s1} -caseína entre os leites de vaca e cabra, não se avaliou se alergias a esta proteína ocorrem em humanos e, se ocorrem, se estas podem ser curadas pela substituição do leite de vaca por cabra (Jenness, 1980). A boa tolerância do uso do leite de cabra se traduz positivamente quando a alergia às proteínas do leite de vaca se manifesta em sintomas gastrintestinais e de vias aéreas superiores menos intensas. Os

autores concordam que, apesar dos excelentes benefícios do leite de cabra, casos de reações cruzadas entre proteínas homólogas do leite de vaca podem ocorrer. O leite de cabra vem sendo utilizado em casos de inapetência, repulsa, cólicas, vômitos, problemas de sono, comportamentos pós-prandiais inadequados e eczemas, relacionados ou agravados pela ingestão de leite de vaca (Fisberg et al., 1999).

Também o consumo de leite pode gerar desconforto ou dificuldade de digestão associada à gordura, no que se refere a seu teor e tamanho dos glóbulos, além do tipo de ácido graxo presente (Furtado, 1981). A grande digestibilidade do leite de cabra, quando comparado ao leite de vaca, torna-o muito recomendado por médicos e nutricionistas para pessoas idosas, doentes, convalescentes e crianças (Furtado & Wolfschoon-Pombo, 1978; Silva, 1998, citado por Silva et al., 2001; Richards et al., 2001; Costa, 2003), e está associada a diferenças na gordura e na estrutura dos glóbulos de gordura entre esses leites. O tamanho dos glóbulos de gordura varia na mesma proporção, de 1 a 10 μm . Porém, o leite de cabra apresenta maior proporção de pequenos glóbulos, favorecendo o ataque das lipases digestivas devido à maior área de exposição. Esta diferença pode ser ainda maior, de acordo com as diferentes raças bovinas (Walker, 1968, citada por Furtado, 1981; Jenness, 1980).

Park (1993) indica que os diâmetros médios dos glóbulos de gordura nos leites de cabra e vaca foram reportados como, respectivamente, 3,49 e 4,55 μm . Entretanto, não se podem encontrar evidências experimentais de que o leite de vaca homogeneizado, com glóbulos de gordura reduzidos a 1 - 2 μm , seja digerido mais rapidamente que o leite não homogeneizado (Jenness, 1980). Richards et al. (2001) destacam que o leite de cabra, devido à sua composição particular e características físico-químicas, é de alta digestibilidade e pode ser utilizado por indivíduos com algumas deficiências enzimáticas ou problemas alérgicos decorrentes do consumo de leite de vaca. Jenness (1980) destaca que o

tamanho dos glóbulos de gordura na dieta não parece ser limitante para o ataque das lipases em presença de sais biliares no intestino.

A distribuição dos ácidos graxos também difere entre os leites caprino e bovino, apresentando, o primeiro, cerca de 20% dos ácidos graxos de cadeias carbônicas curta e média (4 a 12 carbonos, englobando ácido butírico, capríco, caprílico, cáprico e láurico, saturados). Já no leite de vaca estes correspondem a 10% a 20% dos ácidos graxos. As lipases atacam mais rapidamente as ligações éster formadas com ácidos graxos de cadeia curta do que com os de cadeia longa, de forma que esta diferença parece contribuir para uma digestão mais rápida da gordura (Jenness, 1980), além dos ácidos graxos de menor massa molecular não atingirem a grande circulação, indo ter direto ao fígado pela veia porta (Alais, 1974, citado por Furtado, 1981). A distribuição da gordura no leite de cabra é mais uniforme que no leite de vaca em diferentes temperaturas, tanto devido ao tamanho menor dos glóbulos, quanto devido à ausência de “aglutinina”, uma euglobulina aglutinante que provoca o agrupamento dos glóbulos de gordura quando o leite de vaca é resfriado.

Uma questão sempre considerada é a possibilidade das proteínas do leite de cabra serem digeridas mais rapidamente e seus aminoácidos absorvidos mais eficientemente que os do leite de vaca. De fato, o leite de cabra forma uma coalhada mais leve, suave, fina, macia e friável, quando acidificado, provavelmente devido à pequena ou inexistente quantidade de α_{s1} -caseína neste leite, que parece ser atacada mais rapidamente pelas proteases estomacais, embora não haja evidências experimentais deste fato. A retenção de nitrogênio, entretanto, foi constatada ser menor em crianças alimentadas com leite de cabra que com leite de vaca em um estudo. A coalhada leve do leite de cabra também pode ser uma vantagem na dieta de adultos que sofram de distúrbios gastrintestinais ou úlceras (Jenness, 1980; Furtado, 1981). Costa (2003) relata

que a coalhada obtida do leite de cabra tem perfeita digestão em um curto espaço de tempo.

O tamanho das micelas de caseína varia consideravelmente dentro e entre as espécies. Estas parecem ser menores no leite de cabra do que no leite de vaca (50 e 75 nm, respectivamente). A frequência de distribuição do diâmetro das micelas aparentemente varia com o estágio de lactação (Le Jaouen, 1981, citado por Guimarães, 1993). Jenness (1980) ressalta que, no leite de cabra, uma pequena parte das micelas de caseína possui cerca de 200 nm de diâmetro, sedimentando-se facilmente e a maioria possui diâmetro menor que 80 nm, e concorda que a proporção de micelas pequenas é muito maior que no leite de vaca. Conforme Jaubert (1992), o tamanho médio das micelas caprinas é superior ao das bovinas. Contudo, os autores consultados nesta revisão destacam unanimemente uma larga distribuição de tamanho e a presença de numerosas micelas de pequeno tamanho (40 nm) ao lado de partículas grosseiras com diâmetro excedendo até 250 nm.

Fisberg et al. (1999) reportaram que houve diferenças significativas na ingestão láctea, quando comparados leite de cabra e vaca. Os volumes médios de aceitação do leite de cabra, em pó e UHT, foram duas vezes superiores aos do leite de vaca. A aceitabilidade do leite e produtos de leite de cabra está associada a suas características sensoriais. Guimarães (1993) indica que o leite de cabra caracteriza-se pelo aroma e sabor *sui generis*, agradáveis ou desagradáveis ao paladar humano, dependendo dos hábitos alimentares e da forma de consumo: leite, queijo, leites fermentados e outros. Na utilização do leite de cabra para produção de queijos, o sabor e o aroma são os fatores mais importantes para o consumidor, como na França e Noruega; mas, para a maioria dos outros produtos, principalmente no leite fluido, a presença do “flavour” é indesejável. Sua presença está relacionada a vários fatores, como os genéticos e ambientais, sendo mais proeminente no creme e manteiga. No leite desnatado e soro de leite,

encontrou-se “flavour” menos pronunciado que no leite integral. Quantidades significativas de ácidos graxos voláteis foram encontradas em leite com forte sabor. Os principais ácidos graxos voláteis em queijos com sabor proeminente foram os de cadeia curta (C₄ a C₁₀). Encontrou-se também uma correlação positiva entre atividade de lipase e o sabor e aroma.

De acordo com Le Jaouen (1981, citado por Guimarães, 1993), leite de cabra fresco, ordenhado e conservado higienicamente, não apresenta cheiro nem sabor mais forte que o leite de vaca, mas pode apresentar gosto característico se produzido por cabras com baixa produção e que são alimentadas com forrageiras de odor acentuado. A presença do reprodutor próximo às cabras em lactação também pode ser um fator externo responsável pelo “flavour” do leite de cabra.

2.2 Controle de qualidade

2.2.1 Importância do controle de qualidade de leite de cabra

O controle de qualidade do leite de cabra apresenta a mesma importância que o atribuído a qualquer outro produto do setor lácteo ou alimentar. Deve, principalmente, avaliar e assegurar a qualidade, detectando inclusive fraudes ou outros problemas que depreciem suas propriedades, e orientar a produção e industrialização deste produto. A composição físico-química do leite determina a viabilidade de sua transformação em diversos derivados, interferindo no rendimento industrial, estabilidade frente aos tratamentos térmicos, durabilidade, características sensoriais e aceitação pelo consumidor. Pela sua importância na dieta de adultos e principalmente de crianças, a genuinidade e a boa qualidade bacteriológica do leite de cabra são imprescindíveis (Penna et al., 1999; Almeida et al., 2000).

Fatores como o tempo de lactação, a raça dos animais, o período de ordenha e o clima da região afetam a composição do leite caprino, conforme conclusão de uma pesquisa extensiva desenvolvida na região leiteira de Goiânia.

Os resultados obtidos, conforme os autores, são diferentes dos de outras regiões e daqueles estabelecidos pelo regulamento regional do estado do Rio de Janeiro (Tanezini et al., 2000) . Os autores defendem ainda que se evite a exploração empírica do produto, planejando racionalmente a produção e o processamento tecnológico para obtenção de rendimento mais elevado, maior margem de lucro, avaliação de custos e melhoria da qualidade de produtos derivados.

A revisão de literatura mostra que os queijos produzidos com leite caprino são os mais pesquisados daqueles derivados do leite. Os demais derivados são trabalhados, analisados e avaliados usando técnicas conhecidas para o leite bovino. No entanto, nem sempre o emprego destas técnicas é possível ou desejável para o leite caprino (Tanezini et al., 2000).

2.2.2 Fraude do leite de cabra por adição de leite de vaca

O leite de cabra está, como todo leite, sujeito a vários tipos de fraudes. Algumas são relativamente comuns e de fácil verificação, como a adição de água ou substâncias conservadoras e reconstituintes (Dias et al., 2002).

A produção comercial de leite caprino como uma especialidade e um produto de alto preço (cerca de 2,5 vezes mais alto que o leite de vaca, conforme Almeida et al., 2001) traz consigo um potencial de adulteração pela adição de leite bovino, sendo, inclusive, relativamente freqüente utilizar a mistura com este último para a fabricação de queijos. A substituição do leite de ovelhas e cabras por leite de vaca é uma prática fraudulenta na indústria láctea. Desconsiderando o uso cuidadoso de culturas starter preparadas em leite de vaca, as principais razões para esta adulteração são, além do aspecto econômico citado, o rendimento muito menor do leite de ovelhas e cabras, respectivamente, e o fato do leite de vaca estar disponível durante todo o ano em quantidades suficientes.

Para desencorajar este potencial de adulteração, vigilância severa deve ser implementada para detectar estas misturas no leite caprino (Szijarto & van

de Voort, 1983). Os objetivos deste controle abrangem também a garantia da genuinidade de queijos que, em sua denominação de origem, incluem como matéria-prima leite de cabra. Por causa da regulamentação específica da União Européia referindo-se à compensação monetária e reembolso, a declaração de fraude em queijos é de interesse econômico para importadores.

Desta forma, a identificação da espécie da qual o leite é proveniente representa um problema considerável para analistas de alimentos e autoridades fiscais, que têm que garantir que o leite e derivados não foram adulterados e foram rotulados fielmente (Mayer et al., 1997). Furtado (1983) também destaca que, por razões éticas, é desejável assegurar que o leite de cabra oferecido para consumo seja livre de misturas com leite de vaca. A ocorrência de adulterações de qualquer natureza implica, além de abuso contra a economia do consumidor, em danos significativos à saúde pública, contrariando o código de Defesa do Consumidor e a legislação brasileira vigente (Almeida et al., 2001). Segundo a base conceitual do Programa Nacional de Alimentação e Nutrição, ações voltadas a garantir a segurança alimentar e nutricional da população viabilizam a prática ao direito humano à alimentação e nutrição, extrapolando o setor saúde e alcançando um caráter intersetorial (BRASIL, 1999).

De acordo com vários trabalhos, o leite de cabra e o leite de vaca apresentam características físico-químicas e de composição bastante similares, o que dificulta a detecção de adulterações com leite de vaca pela aplicação de métodos de rotina. Para garantir a genuinidade deste produto, há necessidade de métodos analíticos que possibilitem o controle deste tipo de adulteração. Entretanto, tais métodos não estão definidos pelos órgãos responsáveis pela fiscalização e garantia da qualidade do produto (Almeida et al., 2001). Há necessidade de métodos rápidos e eficientes, que possam ser usados para controle de rotina do leite recebido pela indústria para detectar a mistura de leite de diferentes espécies (Ramos & Juárez, 1985; Molina et al., 1999).

2.2.3 Métodos aplicáveis á detecção de mistura de leites de diferentes espécies

Nos últimos anos, muitas técnicas analíticas para detecção de misturas de leite de diferentes espécies têm sido desenvolvidas e usadas (Furtado, 1983a; Ramos & Juárez, 1985; Mayer et al., 1997). Apesar dos muitos trabalhos dirigidos a estudar métodos de análise para detectar a adulteração de leite de cabra com leite de vaca, atualmente se segue investigando nesta linha com o objetivo de detectar misturas de espécies em produtos lácteos, particularmente em queijos (Ramos & Juárez, 1985). Muitos métodos têm sido recentemente publicados, como atualizações em métodos imunológicos ou técnicas baseadas em DNA. Por outro lado, há poucos estudos aplicados à determinação de altas percentagens de adulteração (Molina et al., 1999).

Ramos & Juárez (1985) avaliaram a sensibilidade e as limitações de métodos imunológicos, cromatográficos, eletroforéticos, etc. Concluíram que alguns destes, apesar de altamente sensíveis, apresentavam limitações aplicativas ou, até mesmo, técnicas, como alto custo, dificuldade de execução e demora na obtenção de resultados.

Bret (1968), citado por estes autores, classifica os métodos de detecção descritos na literatura segundo os procedimentos analíticos utilizados. Assim, descreve os métodos químicos como pouco precisos, os biológicos (mais antigos) como apresentando dificuldades quanto à preparação de anti-soros específicos e os físico-químicos como aqueles que, à primeira vista, apresentam maiores vantagens. Outra avaliação agrupa os métodos de análise segundo se baseiem na composição graxa ou protéica. Os primeiros são muito variados, tendo sido utilizados tradicionalmente os índices de ácidos graxos voláteis solúveis e insolúveis, sobretudo o índice de Polenske. Mais recentemente, foram utilizados métodos cromatográficos para o estudo da composição em ácidos

graxos e, concretamente, uma série de relações de ácidos que mostram menor faixa de variação que os valores dos ácidos graxos individuais.

Entre os métodos baseados na análise das frações protéicas, destacam-se os métodos eletroforéticos e imunológicos. Alguns autores têm estudado o diagrama eletroforético das soroproteínas para detectar a mistura de espécies, mas, tendo em conta as alterações que sofrem estas proteínas durante os tratamentos térmicos e a baixa proporção em que se encontram em produtos como o queijo, o estudo das caseínas sobre distintos suportes tem sido o que apresenta maior interesse. Os métodos imunológicos aplicados à diferenciação de proteínas de leite de distintas espécies têm sido destacados como alternativas mais rápidas e de fácil execução se comparadas aos métodos eletroforéticos. As dificuldades para a obtenção de soros específicos foram superadas por completo, podendo-se hoje adquirir no mercado produtos testados em diferentes laboratórios (Ramos & Juárez, 1985). Mayer et al. (1997) citam também métodos cromatográficos baseados na análise de frações protéicas.

2.2.3.1 Xantina-oxidase

Entre os diversos métodos disponíveis para determinar a presença de leite de vaca em queijo de leite de cabra, Lampo & Caroppo (1980) citam o teste de Monget, teste qualitativo baseado na determinação da atividade de xantina-oxidase. A xantina-oxidase apresenta atividade muito menor (cerca de 10 vezes, em média) no leite de cabra que no de vaca; o baixo conteúdo de xantina-oxidase em leite de cabra não parece ser devido à carência de molibdênio (Jenness, 1980; Ramos & Juárez, 1985). Este método, porém, apresenta algumas falhas, tendo sido sugeridas modificações, como a medição do conteúdo em xantina-oxidase por espectrofotometria. Aplica-se a leite cru e pasteurizado (máximo 75 °C/20 s) e a queijos frescos unicamente (Ramos & Juárez, 1985). É possível evidenciar 2% de mistura, tendo sido patenteado na França (1979). O

método se baseia na capacidade da enzima xantino-oxidase de oxidar a vanilina a ácido vanílico e que este último vem a ser revelado com uma solução de 2,6-dibromoquinona-4-clorimida, que gera uma coloração azul, extraída com butanol e quantificada por leitura espectrofotométrica a 650 nm.

Entretanto, Almeida et al. (2001), avaliando o método, concluíram que não se apresentou adequado para a detecção segura de adulterações nas condições testadas. Contudo, pode ser indicado como método de triagem, com confirmação das amostras suspeitas por testes complementares, já que se observou uma considerável variação no teor ou atividade da enzima, tanto no leite de cabra como no de vaca da região avaliada, mesmo considerando-se apenas leite de conjunto.

Apesar das amostras de leite de cabra apresentarem quase sempre valores sensivelmente menores que os do leite de vaca, concordando com os diversos dados constantes na literatura, os valores encontrados para amostras autênticas de alguns dos rebanhos pesquisados de leite de cabra apresentam interseção com os valores encontrados para leite de vaca. Esta variação natural reforça a necessidade de realização de provas complementares para as amostras que apresentarem absorvância acima da média encontrada (0,074). Amostras que apresentarem valores abaixo da média podem ser consideradas livres de adulteração. Conclui-se que os métodos mais recomendados seriam aqueles que menos sofrerem influência de fatores relacionados à variação de composição natural do leite e/ou aspectos tecnológicos relacionados ao processamento deste.

2.2.3.2 Gordura

com base nas diferenças na distribuição de ácidos graxos entre os leites caprino e bovino, é possível detectar misturas por métodos cromatográficos, mas sempre em proporções não inferiores a 15%-20%, devido à sua ampla faixa de variação por fatores genéticos, ambientais e manejo alimentar.

A gordura do leite de cabra apresenta importante diferença em relação ao leite de vaca, compondo-se de cerca de 18% dos ácidos graxos de cadeia curta (4 a 10 carbonos). Isso representa o dobro de seu teor no leite de vaca (Furtado & Wolfschoon-Pombo, 1978; Gomes et al., 1997), caracterizando o sabor e aroma típicos do leite e dos queijos produzidos com leite de cabra, particularmente os maturados por mofos lipolíticos. Segundo Le Jaouen (1981), citado por Guimarães (1993), os ácidos graxos de cadeia curta (C_4 a C_{10}) representam 15% de todos os ácidos graxos no leite de cabra, comparados com 9% do leite de vaca. Já LeMens (1985), citado pela mesma autora, relata que o leite de cabra contém praticamente duas vezes mais ácidos graxos voláteis insolúveis que o leite de vaca (16,6% contra 8%). Os principais ácidos graxos são o capróico, o caprílico e o cáprico, sendo que estes três ácidos graxos voláteis conferem o “flavour” característico ao leite de cabra.

Jaubert (1992) destaca que a diferença entre os leites das duas espécies está essencialmente na proporção mais elevada do ácido caprílico (C_8) e cáprico (C_{10}) do leite de cabra. Quantidades ligeiramente maiores de ácidos de cadeias curtas e médias (de quatro a quatorze carbonos) foram encontradas na gordura do colostro que na gordura do leite após este período (Jenness, 1980). No início da lactação, a composição dos ácidos graxos apresenta-se diferente: a proporção de C_8 a C_{14} é mais baixa e $C_{18:0}$ e $C_{18:1}$ é maior. Estudos demonstram que, por meio de uma dieta apropriada no que diz respeito à administração de gordura, a gordura do leite pode ser produzida com grandes diferenças em termos de composição e propriedades (Jenness, 1980; Pinto et al., 2000).

Estes métodos são aplicáveis a queijos com avançado grau de maturação, já que as modificações na matéria graxa, salvo em queijos maturados por mofos, são mais escassas que as alterações protéicas. Não são úteis quando a adulteração se dá com emprego de leite desnatado. A análise dos 15 principais ácidos graxos parece ser melhor para distinguir os leites, mas uma série de

relações (como $C_{14:1}/C_{15}$ e $C_{11}/C_{10:1}$ e a presença dos ácidos graxos de cadeia curta; $C_{10:0}/C_{6:0}$) e a determinação individual de todos os ácidos presentes têm sido propostas (Ramos & Juárez, 1985; Bonassi, 1987).

Loewenstein et al. (1980), citados por Bonassi et al. (2000), consideram que a membrana do glóbulo de gordura do leite de cabra é menos estável que a do leite de vaca, o que faz com que seja mais susceptível às mudanças de aroma e sabor relacionados à lipólise. O teor de ácidos graxos livres no leite de vaca recém-ordenhado situa-se em torno de 0,25 miliequivalentes por 100 g de matéria graxa. Bonassi et al. (1996) obtiveram valores da ordem de 0,60 a 1,09 miliequivalentes por litro de leite em ácidos graxos livres, com média 0,84, para leite de cabra.

A determinação dos índices de Polenske e Reichert-Meissl pode ser usada. Estes índices referem-se, respectivamente, aos teores de ácidos graxos caprílico e cáprico, e aos ácidos graxos voláteis solúveis em água, após saponificação da amostra (Brasil, 1981). Seus valores são apresentados por Bonassi (1987): Polenske, para cabra de 2,8 a 3,1 e vaca de 1,8 a 2,8; Reichert, para cabra de 26,1 a 28,6 e para vaca de 26 a 28; relação índice de Polenske/índice de Reichert x 100 para cabra de 30 a 40, e para vaca de 8 a 15.

Um método baseado na ausência do β -caroteno em leite de cabra foi sugerido, mas não foi capaz de detectar a adição de leite de vaca desnatado (Furtado, 1983a).

2.2.3.3 Proteínas

A matéria nitrogenada do leite constitui componente de extrema importância, qualquer que seja a espécie, tanto do ponto de vista nutritivo quanto tecnológico (Bonassi et al., 1996). As diferenças mais marcantes entre os leites caprino e bovino são, em grande parte, devido às proteínas (Guimarães, 1993).

As proteínas do leite bovino são as de origem animal há mais tempo e em maior quantidade consumidas pelo homem. Também, pela facilidade de seu isolamento, são as mais estudadas e das quais se conhece a estrutura primária de quase todas as suas frações. É considerado o sistema protéico alimentício mais caracterizado e as principais frações de interesse utilizadas freqüentemente como padrão (especialmente a caseína) ou referência para estudos e avaliação de outras proteínas alimentares (Furtado, 1999).

O leite bovino contém cerca de 5,3 gramas de nitrogênio por quilograma, dos quais aproximadamente 95% estão na forma de proteínas (nitrogênio protéico) e 5% como nitrogênio não protéico. Em média, 80% do nitrogênio protéico são constituídos por caseínas e 20% por soroproteínas (Walstra & Jenness, 1987).

As caseínas são consideradas um grupo de fosfoproteínas específicas do leite, apresentando baixa solubilidade em pH 4,6, a 20°C. Quase toda a caseína apresenta-se na forma de micelas e inclui quatro tipos de cadeias polipeptídicas: α_{s1} , α_{s2} , β e κ , além de alguns derivados formados por proteólise destas cadeias (Walstra & Jenness, 1987).

O Quadro 1 apresenta um resumo das principais proteínas do leite, seu teor no leite de vaca e a massa molecular, indicando inclusive a abreviatura sugerida para cada fração.

QUADRO 1 Resumo das principais frações protéicas do leite bovino

Proteína e sua abreviatura sugerida	Concentração no leite desnatado (g/litro)	Massa molecular (kDa)
α_{s1} – caseína (α_{s1} – CN)	12 a 15	22,068 a 23,724
α_{s2} – caseína (α_{s2} – CN)	3 a 4	25,230
β – caseína (β -CN)	9 a 11	23,944 a 24,092
κ – caseína (κ -CN)	2 a 4	18,363 a 19,039
β – lactoglobulina (β -LG)	2 a 4	18,205 a 18,286
α -lactoglobulina (α -La)	0,6 a 1,7	14,147 a 14,175
Soroalbumina (SA)	0,4	66,267

Fonte: Eigel et al. (1984)

A distribuição de nitrogênio no leite de cabra foi 0,7% a 0,8% de nitrogênio total (Ntotal), 0,5% a 0,6% de nitrogênio caseínico (Ncaseínico), 0,1% a 0,2 % de nitrogênio de soroproteínas e 0,03% a 0,05% de nitrogênio do nitrogênio-não-protéico. O número de caseína (Ncaseínico/Ntotal) variou de 70 a 74 até 77 a 78, de forma que a maioria dos estudos demonstra que o Ncaseínico representa menor porção do Ntotal em leite de cabra que em leite de vaca. Mas, alguns trabalhos também indicam valores similares para os leites das duas espécies. Essas diferenças podem ser causadas pela aplicação de métodos analíticos diferentes (Jenness, 1980). Bonassi et al. (1996) citaram que o leite de cabra é mais pobre em proteínas que o de vaca (28,18 g/1000 g contra 31,1 g/1000 g), o mesmo ocorrendo com a caseína, razão pela qual o leite caprino apresenta rendimento em queijo ligeiramente menor que o leite bovino. Prata et al. (1998), trabalhando com a raça Saanen na região sudeste do Brasil por um ano, encontraram, pelo método Kjeldahl, que 90,83% do nitrogênio total correspondem à proteína verdadeira e 9,17% à fração nitrogenada não-protéica. Da proteína verdadeira, 81,82% (ou 74,31% do total) correspondem à fração

caseínas e 18,18% (ou 16,51% do total) às demais proteínas remanescentes no soro após a precipitação desta. Os teores médios obtidos foram 2,97% para proteína verdadeira, 2,43% para caseína, 0,54% para proteínas do soro e 0,30% para o nitrogênio não-protéico.

O conteúdo protéico varia bem menos do que o conteúdo lipídico e isto parece estar muito mais relacionado a fatores genéticos do que ambientais. Entretanto, no final da lactação, há um evidente aumento do teor protéico (Le Jaouen, 1981, citado por Guimarães, 1993).

De acordo com Jenness (1980), as cinco principais proteínas do leite de cabra, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, κ , β e α_{s2} caseínas assemelham-se muito a seus homólogos no leite de vaca. O leite de cabra carece de um homólogo da α_{s1} – caseína bovina, a mais abundante proteína do leite de vaca.

Conforme Parkash & Jenness (1968), citados por Guimarães (1993), as principais diferenças entre o leite de cabra e o de vaca estão nas frações de caseína. Estas se distinguem percentualmente em número de resíduos de aminoácidos e em padrões eletroforéticos, sobretudo em relação a α_{s1} caseína, que no leite de vaca se encontra em teores bem elevados e praticamente inexitem no leite de cabra. LeMens (1985), citado pela mesma autora, indica que a média do conteúdo de α s caseína é de 21,2% no leite de cabra contra 40% no leite de vaca e que o conteúdo de β caseína é de 67,4% e 43,3%, respectivamente.

A κ -caseína (κ -CN) foi a primeira caseína do leite de cabra cuja seqüência total de aminoácidos foi determinada. Esta difere da κ -CN do leite bovino por conter 171 contra 169 resíduos de aminoácidos e também pela inserção de valina e histidina nas posições 132 e 133, ocupadas por serina e treonina em leite bovino. Assim como no leite bovino, as posições 105 e 106 são ocupadas por fenilalanina e metionina. A renina (quimosina) hidroliza a molécula entre estes dois resíduos, produzindo os fragmentos chamados *para*- κ -

caseína (resíduos de 1 a 105) e caseinomacropéptido (106 a 171). Há 19 diferenças na seqüência de aminoácidos do caseinomacropéptido (CMP) e apenas 8 na da *para-κ*-caseína entre os leites de vaca e cabra (Jenness, 1980). O CMP caprino apresenta dois grupamentos fosfato nas posições 151 e 168 e o bovino apresenta apenas um (Jaubert, 1992).

A β -caseína (β -CN) é o maior componente protéico do leite de cabra em termos quantitativos. Já foram isolados dois tipos de β -CN caprina, representando a banda eletroforética mais proeminente desta caseína. Estes tipos apresentam a mesma seqüência de aminoácidos, mas diferem por apresentarem 5 ou 6 grupos fosfato, sendo chamados β -CN I e II (Jenness, 1980). Contém 207 resíduos de aminoácidos, em lugar dos 209 da similar bovina. É rica em resíduos de prolina (33, ou 16%), a parte N-terminal da molécula (resíduos 1 – 21), que apresenta uma grande proporção de resíduos ácidos; é particularmente polar, ao passo que o restante da molécula é fortemente hidrofóbico, o que lhe confere um caráter anfifílico pronunciado. A ação da plasmina nas caseínas das duas espécies é muito similar (Jaubert, 1992).

O componente de maior mobilidade (mais rápido) da caseína caprina na eletroforese em sistemas alcalinos representa uma proporção muito menor da caseína total que a α_{s1} -caseína bovina. Este componente é similar em composição à menor caseína bovina, designada α_{s2} – caseína. Uma diferença principal entre α_{s2} e α_{s1} -caseínas é uma ponte dissulfeto na primeira e ausência completa de dissulfeto ou tiol nesta última; α_{s1} e α_{s2} -caseínas bovinas têm cadeias polipeptídicas com, respectivamente, 199 (como sua homóloga caprina, segundo Jaubert, 1992) e 207 resíduos de aminoácidos; as seqüências de aminoácidos diferem marcadamente. Apesar da carência de dados de cabras individuais, parece haver completa carência de α_{s1} -caseína no leite de cabra. Já

foram detectadas duas formas polimórficas de α_s -caseína em exames eletroforéticos de amostras de leite de cabra (Jenness, 1980).

A estrutura primária da caseína α_{s1} B caprina foi estabelecida, mostrando 88% de similaridade com sua homóloga bovina; as variantes A, B ou C variam, em número de resíduos de serina fosforilados, de 7 a 9, mas as três possuem um sítio de fosforilação múltiplo constituído por cinco grupamentos fosfoserílicos consecutivos, da posição 64 a 68. As homólogas bovina e caprina são semelhantes na ausência de cisteína,. Nota-se igualmente a existência de uma região hidrófila (46-77), contendo oito resíduos fosfoserílicos e numerosos resíduos ácidos (ácido glutâmico e aspártico). A α_{s2} -caseína caprina contém 208 resíduos de aminoácidos, diferindo da bovina por, no máximo, 26 resíduos. É rica em resíduos de lisina (24) e apresenta dois resíduos de cisteína próximos, nas posições 37 e 41 da cadeia. O exame da seqüência de aminoácidos leva a supor a existência de 9 a 11 resíduos fosfoserílicos, contra 13 da proteína bovina (Jaubert, 1992).

Os peptídeos formados das caseínas caprinas e ovinas pela ação de proteases são menos amargos que os da caseína de vaca. Destes, os provenientes da α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN) são os mais amargos. Isto sugere que o menor sabor amargo em queijos de leite de cabra e ovelha do que nos de leite bovino deve-se à menor concentração de α_{s1} -CN, ou total ausência desta, nestes queijos (Jenness, 1980).

A ausência, em leite de cabra, de qualquer componente com mobilidade eletroforética similar à da α_{s1} -CN bovina pode ser usada para detecção de adulteração de leite de cabra por leite de vaca. Foi demonstrado que a partir de 1% de adição, a adulteração já pode ser detectada por este método (Jenness, 1980).

A caseína bovina contém α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína na razão aproximada de 4:1:3:1, mas esta relação ainda não foi definitivamente estabelecida para leite de

cabra. Perfis eletroforéticos indicam que o conteúdo de α_{s2} -caseína é muito menor que o de β -CN, mas os resultados são conflitantes. A κ -CN não é bem separada da β -CN nas corridas eletroforéticas usuais. Jaubert (1992), realizando a avaliação quantitativa das caseínas caprinas em HPLC de fase reversa, mostrou que a micela é composta de caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ nas proporções de 11:11:62:16, enquanto as proporções citadas na revisão bibliográfica deste mesmo trabalho são 1:2:5:2; caracteriza a caseína caprina, comparando à sua homóloga bovina, por suas dimensões e grau de mineralização superiores e hidratação inferior. Os resultados obtidos tendem a validar o modelo de estrutura micelar bovina proposto por Schmidt e permitem confirmar o papel determinante das ligações de natureza eletrostática e hidrofóbica que mantêm a integridade das micelas.

A micela de caseína é fortemente mineralizada, apresentando baixa hidratação. O efeito destas alterações é uma redução na estabilidade térmica do leite de cabra (comparativamente ao leite de vaca). Após resfriamento, este leite tem ainda menor resistência ao aquecimento, devido à dissociação da β -caseína, em função do baixo teor de α_{s1} -caseína (Gomes et al., 1997).

Assim, as micelas de leite de cabra parecem diferir marcadamente em muitos aspectos das do leite de vaca e estas diferenças são provavelmente atribuídas à falta de α_{s1} -CN no leite de cabra (Jenness, 1980).

Os métodos imunológicos, baseados em reações de precipitação antígeno-anticorpo, por sua sensibilidade e especificidade, se prestam particularmente bem ao controle de misturas de leites de várias espécies. A adição de 2% de leite de vaca ao de cabra pode ser revelada por técnicas deste tipo e alguns métodos são capazes de diferenciar também o leite fresco do reconstituído. A reação imunológica pode acontecer com as proteínas solúveis menos abundantes do leite, como imunoglobulinas e lactoalbuminas. Os imunossoros são comercializados atualmente na forma de kits de detecção. O método é

de fácil realização, pode ser semiquantitativo (por avaliação da intensidade da linha de precipitação) ou quantitativo. Tem sido aplicado inclusive na detecção de misturas em queijos, pois o processo proteolítico pode não afetar o resultado, até mesmo em produtos com elevados índices de maturação. Portanto, pode ser de utilidade como método de controle em queijarias. Por outro lado, como a técnica se baseia na reação das soroproteínas lácteas com o anti-soro específico, se estas proteínas tiverem sido desnaturadas a reação será negativa.

A aplicação em leite esterilizado de vaca e em queijos fundidos de vaca dá resultados negativos. Técnicas imunoquímicas, que combinam a imunologia e a eletroforese, têm sido descritas, detectando concentrações de 1% a 5% de leite de vaca em leite de cabra (Ramos & Juárez, 1985). Um método muito específico de detecção de caseína bovina tem sido descrito usando imunoblotting com anticorpo policlonal contra β -caseína bovina ou β -lactoglobulina. Foi determinado um limite de detecção de 0,1% para detecção imunológica de leite de vaca em queijos de cabra utilizando a fração γ -caseína bovina (Mayer et al., 1997).

Dos métodos físico-químicos utilizados para a investigação de misturas de espécies, as técnicas eletroforéticas apresentam limites de sensibilidade comparáveis aos métodos biológicos e não requerem a utilização de reativos especiais, ainda que se empreguem instrumentais mais ou menos sofisticados. As duas maiores vantagens do método eletroforético são a não necessidade de nenhuma preparação da amostra, em muitos casos, e a possibilidade de estimar o grau de adulteração (Szijarto & van de Voort, 1983).

A aplicação de eletroforese de caseínas e proteínas do soro ao estudo de misturas de leite de vaca com cabra e ovelha foi capaz de detectar quantidades inferiores a 1% de leite de vaca adicionado por observação visual e 0,1% por medidas fotométricas das frações protéicas obtidas. A detecção de leite de vaca em queijos industrializados se viu dificultada pela degradação das caseínas.

Também foi estudado o uso de eletroforese em acetato celulose (Ramos & Juárez, 1985). Um método simples e direto, usando discos de gel de poliacrilamida, foi desenvolvido para determinação semiquantitativa da adulteração de leite caprino com leite bovino em teores menores que 5%. Este método é usado correntemente na monitorização de rotina da adulteração accidental ou não do leite de cabra na província de Ontário, Canadá (Szijarto & van de Voort, 1983).

A diferença entre os perfis eletroforéticos de proteínas caprinas e bovinas foi observada sobre gel de poliacrilamida ou gel de amido, podendo detectar-se 1% de mistura com ambos os suportes, da mesma forma que em géis alcalinos contendo uréia (Furtado, 1983; Ramos & Juárez, 1985; Szijarto & van de Voort, 1983).

Recentemente, foram utilizadas técnicas mais sofisticadas, como focalização isoeletrica (separação de proteínas pelo ponto isoeletrico) sobre camadas finas de gel de poliacrilamida com uréia, diferenciando as proteínas do leite de vaca no leite de ovelha ou cabra pela γ -caseína presente no leite bovino e não no das outras espécies. A avaliação densitométrica permite detectar níveis de 2% ou 1%, sendo também aplicada a queijos comerciais; o método parece muito interessante, embora tenha que se ter em conta que as γ -caseínas são produtos minoritários e que vários autores têm estabelecido que estas podem formar-se por degradação proteolítica da β -caseína. Pode-se então concluir que os métodos eletroforéticos são de grande utilidade para estudar misturas de leites de forma quantitativa (Ramos & Juárez, 1985).

As análises eletroforéticas têm sido desenvolvidas sobre as frações α_{s1} -caseína, β -caseína, γ -caseína, mas também sobre a fração *para*- κ -caseína. O método de referência na União Europeia (1996) para a detecção de leite e caseinato de vaca em queijos feitos do leite de outras espécies é a eletroforese em foco isoeletrico de γ -caseína após quebra por plasmina. Usando dois padrões

de leite como referência (com 0% e 1% de leite de vaca), as amostras são julgadas positivas se as caseínas bovinas γ_2 e γ_3 estiverem iguais ou maiores que o nível encontrado no padrão de 1% (cabra ou ovelha). O limite de detecção é menor que 0,5% (Mayer et al., 1997).

Eletroforese capilar foi usada para separar e analisar a fração caseínica em misturas de leites de vaca, cabra e ovelha. As diferenças nos perfis eletroforéticos dos leites integrais de cada espécie permitiram a identificação e quantificação do leite de cada espécie em mistura de duas ou três espécies diferentes. O erro na quantificação foi inferior a 2,4% em todos os casos.

Já havia sido sugerido o uso de eletroforese capilar para determinação das porcentagens do leite de diferentes espécies em uma mistura, mas a determinação quantitativa em misturas ternárias não havia sido possível, devido à complexidade do perfil eletroforético obtido. Molina et al. (1999) avaliaram a aplicação da eletroforese capilar como um método rápido, altamente reprodutível e quantitativo para a determinação de misturas contendo altas porcentagens de leites de vaca, cabra e ovelha, mediante a análise de suas frações caseínicas usando modelos estatísticos específicos. O trabalho permitiu concluir que as diferenças nos perfis eletroforéticos das frações caseínicas de leites genuínos de cada espécie podem ser usadas para seleção dos diferentes picos característicos da presença destes tipos de leites nas misturas, que serão usados para identificar e determinar as proporções misturadas. Os resultados obtidos, por serem quantitativos e reprodutíveis, permitem analisar misturas padrão para calibração do sistema e depois analisar misturas desconhecidas. Nos métodos eletroforéticos convencionais, faz-se necessário analisar simultaneamente as misturas-padrão e as misturas desconhecidas, todas as vezes, para obter resultados reprodutíveis. A avaliação dos tempos de migração mostra coeficiente de variação baixo (0,2%), permitindo uma fácil identificação das principais caseínas de cada espécie.

Técnicas cromatográficas têm sido largamente utilizadas para isolamento de proteínas lácteas e metodologias de alta performance são, agora, a base de vários métodos bastante exatos de análise (Strange et al., 1992). A cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP HPLC), assim como a cromatografia de exclusão de íons, tem sido usada para separar soroproteínas de leites de diferentes espécies. A separação de caseínas dos leites bovino, caprino e ovino, usando procedimentos em HPLC, também tem sido descrita. Em alguns casos, o método quantitativo é necessário para identificação dos percentuais de leite de cada espécie em queijos em que se permite a mistura de leites, como alguns na Áustria. Métodos de determinação de γ -caseína (após ação da plasmina) e *para*- κ -caseína por eletroforese com focalização isoelétrica ou HPLC de exclusão de cátions foram avaliados, não sendo efetivos para a quantificação de misturas de leites de diferentes espécies em queijos. Embora o método cromatográfico seja mais rápido, fácil e preciso na determinação dos percentuais de mistura, o eletroforético é mais vantajoso para a análise de muitas amostras, já que permite avaliar um número maior delas simultaneamente, o que é particularmente útil para métodos de controle. Entretanto, a determinação dos percentuais de cada espécie requer avaliações densitométricas demoradas dos géis de amostras de composição desconhecida (Mayer et al., 1997).

2.2.4 Legislação brasileira

Diante da ausência de uma legislação federal, até há pouco tempo, para o leite caprino, alguns estados brasileiros, como o Rio de Janeiro, Ceará, São Paulo e Distrito Federal, elaboraram normas oficiais específicas para a produção e comercialização deste leite. O estado de Pernambuco, por meio de uma legislação de produtos agropecuários, normatiza em parte a sua produção e comercialização (Leite et al., 1999). Penna et al., em 1999, destacavam que o estado de Minas Gerais estava em fase final de redação do seu documento.

Almeida et al. (2001) indicaram que a regulamentação da produção e comercialização do leite de cabra pasteurizado por microusinas ocorreu na cidade de Juiz de Fora, de forma pioneira, com a implantação da legislação municipal, em 1995. Tanezini et al. (2000) ressaltavam a importância de uma legislação específica no estado de Goiás, ou em âmbito federal, tendo em vista a emergente importância e o incremento da caprinocultura no estado, para o controle de qualidade do leite, a fim de evitar prejuízos e erros de interpretação de valores.

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento, por meio de sua Secretaria de Defesa Agropecuária, estabeleceu a Portaria 56 (cabra), de 07/12/1999, Regulamento Técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra. Mais recentemente, pela Instrução Normativa n.º37, de 31 de outubro de 2000, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra.

Estas normas estabelecem metodologias analíticas para o controle de qualidade do leite de cabra, sua periodicidade e os padrões físico-químicos e microbiológicos a serem seguidos, proibindo a mistura com leites de outras espécies ou classificando o produto assim adicionado como fraudado ou falsificado. Entretanto, nem mesmo a recente legislação implementada pelo governo federal prevê metodologia específica para o controle desta adulteração.

Segundo Almeida et al. (2001), uma das dificuldades encontradas, tanto no âmbito municipal quanto no estadual e federal, é a carência de recursos destinados ao controle de qualidade de alimentos. Este fator limita a ação dos órgãos nestas esferas a utilizarem métodos de baixo custo que possibilitam apenas o controle de qualidade de rotina.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar técnicas eletroforéticas convencionais, que possam ser implementadas em laboratórios ou institutos de pesquisa e fiscalização, para detecção de fraudes do leite de cabra pela adição de leite de vaca, permitindo controlar este tipo de adulteração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Planejamento experimental

Com o objetivo geral de avaliar a aplicação de técnicas eletroforéticas para o controle de fraudes de leite de cabra pela adição de leite de vaca, o planejamento experimental adotado abrangeu duas etapas distintas.

Na primeira, foram conduzidas três variações analíticas da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE): native-PAGE, ou eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras em condições não desnaturantes; SDS-PAGE, ou eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, empregando amostras tratadas com SDS (dodecil sulfato de sódio, detergente aniônico), e UREA-PAGE, ou eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras tratadas com uréia. As amostras foram constituídas de leite de cabra, leite de vaca e leite de cabra com adições de leite de vaca. Os objetivos desta primeira etapa incluíram a seleção, dentre as técnicas indicadas acima, da mais adequada à detecção da fraude, a implementação da técnica selecionada e a verificação da influência de processamentos (térmico e desidratação), e do Bronopol[®] (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), agente muito utilizado para conservação de amostras de leite, na metodologia selecionada.

Na segunda etapa, a variação analítica selecionada e implementada na fase anterior foi aplicada para a definição dos perfis eletroforéticos dos leites genuínos de vaca e cabra, e para a determinação do limite mínimo de detecção da técnica selecionada.

3.2 Local e instituições envolvidas

O Núcleo Industrial do Centro Tecnológico – Instituto de Laticínios Cândido Tostes, da EPAMIG, em Juiz de Fora, MG, forneceu as amostras de leite de cabra para a primeira fase do experimento e as amostras de leite de vaca

empregadas em todo o trabalho. As amostras de leite de cabra empregadas na segunda fase foram coletadas em três capris nos municípios de Coronel Pacheco, Piau e Tabuleiro, MG, próximos à cidade de Juiz de Fora, MG. As amostras de produtos processados foram adquiridas no comércio local.

As determinações analíticas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Alimentos da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (FFB - UFJF) e as avaliações densitométricas no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da EMBRAPA – Gado de Leite, ambos em Juiz de Fora, MG.

3.3 Primeira etapa

3.3.1 Amostras

Leite cru de cabra e de vaca foi coletado semanalmente, compondo duas amostras de leite de conjunto para o leite de cabra, e quatro ou seis amostras também de conjunto de leite de vaca. Essas amostras foram fornecidas pelos produtores e trazidas no caminhão de coleta, tendo sido conservadas em frascos de vidro ou plástico resistente, com tampa, sob refrigeração (em banho de gelo para transporte e, posteriormente, em geladeira), até o momento da análise. Também foram coletadas amostras de leite de vaca de cinco tanques de expansão comunitários, acondicionadas e conservadas da mesma forma.

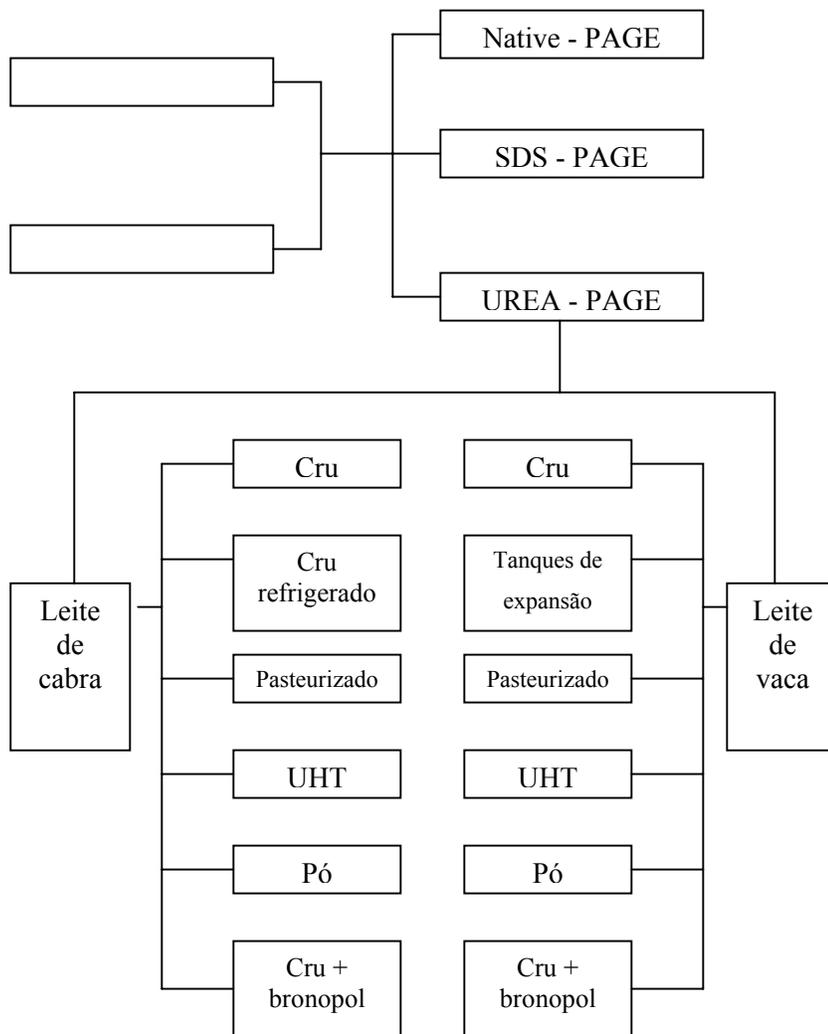
Na comparação entre as metodologias testadas, foram empregadas também amostras de leite de cabra adicionadas de leite de vaca, nas seguintes proporções: 4,8 mL de leite de cabra mais 0,2 mL de leite de vaca (4%); 4,5 mL de leite de cabra mais 0,5 mL de leite de vaca (10%); 4,0 mL de leite de cabra mais 1,0 mL de leite de vaca (20%); 2,5 mL de leite de cabra mais 2,5 mL de leite de vaca (50%) e 1,0 mL de leite de cabra mais 4,0 mL de leite de vaca (80%).

As amostras de leite pasteurizado, de vaca e de cabra, foram obtidas pelo tratamento das amostras de leite cru coletadas em laboratório, utilizando-se o processo de pasteurização lenta (60° a 65°C por 30 minutos, em banho-maria; a temperatura mínima atingida durante o tratamento foi 58°C, e o resfriamento até temperatura ambiente ocorreu naturalmente). Amostras de leite UHT e em pó, também de vaca e cabra, integrais, foram adquiridas no comércio local.

Para avaliação da influência da conservação com Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), as amostras coletadas de leite cru, de vaca e de cabra, foram adicionadas deste conservante na proporção de 38 mg (dois comprimidos) para 60 mL de amostra. As amostras submetidas a este tratamento não foram conservadas a frio.

Também foi avaliada a influência da conservação da amostra sob refrigeração, tendo sido examinadas amostras de leite de cabra recentes (dois dias após a coleta) e conservadas em geladeira por, pelo menos, nove dias antes da preparação para análise.

O Fluxograma 1 descreve a primeira etapa da fase experimental..



Fluxograma 1 Diagrama do planejamento experimental, primeira etapa

A preparação das amostras para análise envolveu sua dissolução em solução tampão de amostra, cuja composição depende da metodologia adotada, na proporção de 10 mg ou 30 μ L de amostra, respectivamente, em pó ou fluida, para 1 mL do tampão apropriado, seguida de aquecimento e centrifugação, em condições adequadas para cada técnica testada. Após preparação, as amostras foram analisadas imediatamente, conservadas em geladeira ou congeladas em freezer até o momento da análise. Outras seqüências de preparação foram testadas nos ensaios preliminares para implementação das metodologias.

3.3.2 Metodologia

A seqüência de análise, após a preparação das amostras, envolveu as seguintes fases: preparação dos géis, injeção das amostras, corrida, revelação e conservação.

Foi usado equipamento em sistema vertical (slab) de placas, modelo HOEFER SE 600, marca Amersham Pharmacia Biotech (San Francisco, CA, USA), com fonte modelo EPS 301, da mesma marca. Os géis foram preparados cumprindo-se a seguinte seqüência:

- as placas de vidro foram montadas conforme instruções do fabricante, formando um “sanduíche” com as placas separadas pelos espaçadores molhados em pequena quantidade de água destilada, com auxílio do “spacer mate” e da régua para medir a espessura do gel; as placas foram fixadas com os prendedores e encaixadas no suporte, com auxílio dos parafusos, sobre as borrachas de nivelamento; quando preparado apenas um conjunto de placas, a placa acrílica foi encaixada num dos slots, fixada pelos prendedores;
- o encaixe da cuba de tampão superior foi testado, procedendo a ajustes nas placas, se necessário, até obter um encaixe perfeito, evitando vazamentos do tampão de eletrodo no momento da corrida;

- a solução do gel de separação foi preparada, na concentração desejada, pela mistura dos componentes indicados conforme a técnica adotada, adicionando, por último, o TEMED e o persulfato de amônio;

- a mistura preparada foi vertida no interior de uma das placas, vagarosamente, até uma altura que permitisse uma sobra de aproximadamente 2 a 3 cm na placa (próximo do segundo parafuso de cima para baixo dos prendedores). Procedeu-se a preparação de um gel de cada vez;

- o volume da célula foi completado com água destilada, adicionada muito lentamente, de preferência com auxílio de uma seringa com agulha;

- aguardou-se cerca de 30 minutos até a completa polimerização do gel;

- a água destilada adicionada foi descartada e o resíduo seco com papel-filtro;

- procedeu-se à preparação da solução do gel de empilhamento, adicionando, por último, o TEMED e o persulfato de amônio;

- a mistura preparada foi transferida para o interior de uma das placas, vagarosamente, até uma altura que permitisse uma sobra de, no máximo, 1 cm na placa (acima do primeiro parafuso dos prendedores). O pente que forma os poços para a injeção das amostras foi inserido, iniciando a colocação por uma das laterais e tendo o cuidado de não permitir a formação de bolhas. Procedeu-se à preparação de um gel de cada vez;

- aguardou-se cerca de 30 minutos até a completa polimerização do gel;

- o tampão do eletrodo foi diluído na proporção de cinco vezes, preparando-se um volume de 3 L para a cuba inferior e 500 mL para a cuba superior. A solução da cuba inferior pôde ser aproveitada algumas vezes, mas a da cuba superior foi preparada imediatamente antes do uso;

- os pentes foram retirados e os poços formados guarnecidos com solução tampão de corrida da cuba superior, com auxílio de uma pipeta;

- as amostras foram aplicadas nos poços: a quantidade de amostra injetada foi de 20 μL por poço, tendo sido testadas outras quantidades (10, 30 e 40 μL), sempre retirados da parte mais central dos tubos. Simultaneamente, procedeu-se à identificação dos poços;

- a cuba do tampão superior foi encaixada sobre as placas com os géis, com auxílio dos parafusos próprios;

- dentro da cuba inferior foram vertidos 3 L de tampão de eletrodo ou corrida e encaixado o trocador de calor (que contém o eletrodo inferior) nas ranhuras próprias;

- a montagem da cuba inferior foi completada, retirando-se o conjunto de placas com os géis do suporte usado na montagem e encaixando-o na cuba inferior, sobre o trocador de calor;

- o volume restante de tampão de corrida superior foi transferido para a respectiva cuba, de forma bem lenta;

- a tampa do conjunto foi encaixada, atentando para a conexão dos eletrodos, os fios destes ligados à fonte, e a fonte à tomada, de preferência por meio de um estabilizador de voltagem;

- a fonte foi regulada para a voltagem de corrida no gel de empilhamento (depende da técnica empregada), a amperagem para o máximo de 200 mA, sendo, então, acionada para o início da corrida;

- aguardou-se que a linha azul formada pelo marcador de corrida (azul de bromofenol) ultrapassasse a linha do gel de separação, e a voltagem foi regulada para a de corrida no gel de separação, mantendo-se a regulação da amperagem;

- a variação de amperagem foi acompanhada durante a corrida (observou-se redução com o tempo). No método UREA-PAGE, também o aquecimento do conjunto foi observado, ligando-se a circulação de água pelo trocador de calor ou procedendo à corrida em geladeira, se necessário;

- quando o marcador de corrida atingiu cerca de 1cm do limite inferior da placa, para as técnicas de native-PAGE e SDS-PAGE, ou saiu da placa para o tampão de eletrodo, no método UREA-PAGE, o processo foi terminado, desligando-se a fonte;

- a tampa do conjunto foi retirada e, em seguida, as placas contendo os géis, que se encontram fixadas à cuba superior;

- o conjunto foi desmontado, abrindo-se os “sanduíches” cuidadosamente, com auxílio do lado afilado da régua de medição do gel que compõe o conjunto, permitindo que o gel permanecesse sobre uma das placas de vidro. O gel de empilhamento foi descartado, o gel identificado e transferido para uma cuba contendo o fixador (native-PAGE E SDS-PAGE), ou a solução corante (UREA-PAGE);

- a seqüência de fixação, coloração e descoloração apropriada foi seguida em função da técnica adotada;

- os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução conservante de glicerol 10% v/v adicionada (UREA-PAGE) ou não de solução fixadora (native-PAGE E SDS-PAGE), conforme a técnica adotada.

Os géis revelados foram analisados por densitometria no aparelho modelo GS – 700 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), utilizando-se o software Molecular AnalystTM/PC, versão 1.4, da mesma marca, conforme instruções de seus respectivos manuais que acompanham o equipamento. A intensidade dos sinais (bandas ou pontos) é diretamente proporcional à concentração da fração protéica identificada por seu R_f e, na representação gráfica, é dada pela intensidade da coloração do corante e pela área do pico relativo à banda no densitograma (representa a absorbância obtida com uma fonte de luz branca).

3.3.2.1 Método native-PAGE

A preparação dos géis (4,5% de acrilamida para o gel de empilhamento e 12,5% para o gel de separação) foi executada segundo metodologia clássica (Laemmli, 1970), com adaptações. Os géis foram corados pelo método descrito por Merrill (1990), com adaptações. As técnicas foram baseadas no protocolo para SDS-PAGE, com substituição deste detergente e do 2-mercaptoetanol por água destilada.

a) Preparação das soluções

Acrilamida/Bis

Foram dissolvidos 146 g de acrilamida e 4 g de N,N,N,N – metileno bisacrilamida (BIS) em água destilada suficiente para 500 mL de solução.

Tampão TRIS – HCl 1,5 mol/L, pH 8,8

Foram dissolvidos 54,45 g de tris (hidroximetil) metil amina (TRIS) em aproximadamente 150 mL de água destilada, o pH ajustado para 8,8 com solução de HCl 1 mol/L e o volume completado com água destilada suficiente para 300 mL.

Tampão TRIS – HCl 0,5 mol/L, pH 6,8

Foram dissolvidos 6 g de TRIS em aproximadamente 60 mL de água destilada e acrescentados 2,86 mL de HCl p.a. Procedeu-se ao ajuste do pH para 6,8 com solução de HCl 1 mol/L e completou-se o volume com água destilada suficiente para 100 mL.

Persulfato de amônio

Pesou-se 0,5 g de persulfato de amônio p.a., acrescentando 4,5 mL de água destilada e dissolvendo pela agitação do frasco. Esta solução, em razão de sua instabilidade, foi preparada no momento do uso.

Azul de bromofenol 0,5 % m/v

Foram dissolvidos em água destilada suficiente para 40 mL, 0,2 g de azul de bromofenol.

Tampão de amostra

Foram misturados 6,0 mL de água destilada, 1 mL de tampão TRIS – HCl 0,5 mol/L (pH 6,8), 0,8 mL de glicerol e 0,2 mL de azul de bromofenol 0,5% m/v, procedendo à preparação desta solução no momento do uso.

Tampão de eletrodo (ou de corrida), pH 8,3, solução estoque (5 vezes concentrada)

Foram dissolvidos 45 g de TRIS e 216 g de glicina em água destilada suficiente para 3 L de solução; esta solução foi armazenada em geladeira. No momento da corrida, 300 mL da solução estoque de tampão de corrida foram diluídos para 1.200 mL em água destilada.

Solução fixadora

Foram dissolvidos em água destilada suficiente para 400 mL de solução final, 160 mL de metanol e 80 g de ácido tricloroacético p.a.

Solução corante

Misturou-se, até dissolução completa, 1 g de azul brilhante de Comassie (Comassie Blue R-250, $C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$, massa molecular 825,99), 400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético R e 500 mL de água destilada.

Solução descorante

Foram dissolvidos 500 mL de metanol e 200 mL de ácido acético R em 1.300 mL de água destilada.

Glicerol 10% v/v

Foram dissolvidos 100 mL de glicerol em água destilada suficiente para 1.000 mL de solução.

b) Preparação das amostras

As amostras, após dissolução na solução tampão de amostra, foram submetidas a banho-maria 95°C por 5 minutos e centrifugadas, em temperatura ambiente, por 15 minutos a 12.500 x g.

c) Preparação dos géis**Gel de empilhamento**

- 0,75 mL de acrilamida/Bis
- 1,25 mL de tampão TRIS – HCl 0,5 mol/L pH 6,8
- 2,95 mL de água destilada
- 20 µL de TEMED
- 30 µL de persulfato de amônio

Gel de separação

Os géis de separação foram preparados em diferentes concentrações, conforme as proporções de seus componentes. No Quadro 2, estão descritos os volumes empregados nas metodologias adotadas.

A fonte foi regulada, inicialmente, para a voltagem de corrida no gel de empilhamento (60 V), a amperagem para o máximo de 200 mA e ligada, iniciando-se a corrida. Quando a linha azul formada pelo marcador de corrida (azul de bromofenol) ultrapassou a linha do gel de separação (cerca de 40 minutos depois), a voltagem foi novamente regulada, desta vez para a de corrida no gel de separação, ou seja 120 V, mantendo-se a regulagem da amperagem.

Após a corrida, os géis foram mantidos na solução fixadora por uma hora e transferidos para uma cuba contendo solução corante. Permaneceram imersos nesta por três horas, sendo então transferidos para outra cuba contendo solução descorante. A imersão no descorante foi mantida overnight (cerca de 12 horas) ou até atingir a coloração adequada e, finalmente, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução conservante de glicerol 10% v/v.

QUADRO 2 Preparação dos géis de separação em diferentes concentrações para procedimentos de native-PAGE

Componente	Gel a 12,5 %
Acrilamida/Bis	12,5 mL
Tampão TRIS – HCl 1,5 mol/L pH 8,8	7,5 mL
Água destilada	9,75 mL
Persulfato de amônio	0,30 mL
TEMED	30 µL

3.3.2.2 Método SDS – PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (concentrações de 4,5% de acrilamida para o gel de empilhamento e 7%, 10%, 12,5%, 15% e 17,5% de acrilamida para o gel de separação) foi executada segundo metodologia clássica (Laemmli, 1970), com adaptações. Os géis foram corados pelo método descrito por Merril (1990), com adaptações.

a) Preparação das soluções

As soluções são preparadas conforme descrito para o método native-PAGE, sendo necessário modificar apenas o tampão de amostra e o tampão de eletrodo (ou de corrida), pH 8,3, solução estoque (cinco vezes concentrada). Além disso, mais uma solução, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% m/v, precisa ser preparada.

Tampão de amostra

Misturar 4,0 mL de água destilada, 1 mL de tampão TRIS – HCl 0,5 mol/L (pH 6,8), 0,8 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS 10% m/v, 0,4 mL de 2-mercaptoetanol e 0,2 mL de azul de bromofenol 0,5% m/v, procedendo à preparação desta solução no momento do uso.

Tampão de eletrodo (ou de corrida), pH 8,3, solução estoque (cinco vezes concentrada)

Dissolver 45 g de tris (hidroximetil) metil amina (TRIS), 216 g de glicina e 15 g de SDS p.a. em água destilada suficiente para 3 L de solução e armazenar em geladeira. No momento da corrida, diluir 300 mL da solução estoque de tampão de corrida para 1.200 mL em água destilada.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% m/v

Dissolver 10 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água destilada em quantidade suficiente para 100 mL. Esta solução deve ser armazenada em temperatura ambiente.

b) Preparação das amostras

As amostras, após dissolução na solução tampão de amostra, foram submetidas a banho-maria a 95°C por 5 minutos e centrifugadas, em temperatura ambiente, por 15 minutos a 12.500 x g.

c) Preparação dos géis**Gel de empilhamento**

- 0,75 mL de acrilamida/Bis
- 1,25 mL de tampão TRIS – HCl 0,5 mol/L pH 6,8
- 50 µL de SDS 10% m/v
- 2,95 mL de água destilada
- 20 µL de TEMED
- 30 µL de persulfato de amônio

Gel de separação

Os géis de separação podem ser preparados em diferentes concentrações, conforme as proporções de seus componentes. No Quadro 3, estão descritos os volumes empregados nas metodologias adotadas.

QUADRO 3 Preparação dos géis de separação em diferentes concentrações para procedimentos de SDS-PAGE

Componente	Gel a 7 %	Gel a 10 %	Gel a 12,5 %	Gel a 15 %	Gel a 17,5 %
Acrilamida/Bis	7 mL	10 mL	12,5 mL	15 mL	17,5 mL
Tampão TRIS – HCl 1,5 mol/L pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL
SDS 10% m/v	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL
Água destilada	15,00 mL	12,00 mL	9,45 mL	6,90 mL	4,40 mL
Persulfato de amônio	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL
TEMED	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL

A fonte foi regulada, inicialmente, para a voltagem de corrida no gel de empilhamento (60 V), a amperagem para o máximo de 200 mA e ligada, iniciando-se a corrida. Quando a linha azul formada pelo marcador de corrida (azul de bromofenol) ultrapassou a linha do gel de separação (cerca de 40 minutos depois), a voltagem foi novamente regulada, desta vez para a de corrida no gel de separação, ou seja 120 V, mantendo a regulação da amperagem.

Após a corrida, os géis foram mantidos na solução fixadora por uma hora, e transferidos para uma cuba contendo solução corante. Permaneceram imersos neste por 3 horas, quando foram transferidos para outra cuba contendo solução descorante. A imersão no descorante foi mantida overnight (cerca de 12 horas) ou até atingir a coloração adequada e, finalmente, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução conservante de glicerol 10% v/v.

3.3.2.3 Método UREA-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia (4% de acrilamida para o gel de empilhamento e 7%, 8,5% e 10% para o gel de separação) foi executada segundo método adaptado Andrews (1983). Os géis foram corados diretamente pelo método baseado em Blakesley e Boezi (1977).

a) Preparação das soluções:

Acrilamida/Bis

Foram dissolvidos 40 g de acrilamida e 2 g de N,N,N,N – metileno bisacrilamida (BIS) em água destilada suficiente para 100 mL de solução.

Tampão do gel de empilhamento

Foram dissolvidos 4,15 g de tris (hidroximetil) metil amina (TRIS), 150 g de uréia e 2,2 mL de HCl p.a. em água destilada suficiente para 500 mL, e o pH ajustado para 7,6.

Tampão do gel de separação

Foram dissolvidos 32,15 g de TRIS, 192,85 g de uréia e 2,86 mL de HCl p.a. em água destilada suficiente para 500 mL de água destilada e o pH ajustado para 8,9.

Persulfato de amônio

Pesou-se 0,5 g de persulfato de amônio p.a., acrescentando-se 4,5 mL de água destilada e dissolvendo pela agitação do frasco. Esta solução, em razão de sua instabilidade, foi preparada no momento do uso.

Tampão de corrida ou tampão do eletrodo

Foram dissolvidos 15 g de TRIS e 73 g de glicina em água destilada suficiente para 1 L; no momento do uso, esta solução foi diluída para um volume cinco vezes maior (total de 5L).

Tampão de amostra

Foram dissolvidos 0,75 g de TRIS, 49 g de uréia, 0,4 mL de HCl p.a., 0,7 mL de 2-mercaptoetanol e, aproximadamente, 0,15 g de azul de bromofenol em água destilada suficiente para 100 mL de solução.

Solução corante

Dissolveu-se 1 g de azul brilhante de Comassie R-250 em 500 mL de água destilada e adicionou-se igual volume de ácido sulfúrico 1 mol/L. Após repouso overnight (cerca de 12 horas), a solução foi filtrada em algodão hidrófilo e misturada ao filtrado, na proporção 9+1, hidróxido de potássio 10 mol/L. Foi, então, adicionada massa suficiente de ácido tricloroacético para formar uma solução 12% (m/v).

b) Preparação das amostras

As amostras, após dissolução na solução tampão de amostra, foram submetidas a banho-maria a 40°C por 1 hora e centrifugadas, em temperatura de 5°C, por 10 minutos a 10000 x g.

c) Preparação dos géis

Gel de empilhamento

- 0,78 mL de acrilamida/Bis;
- 7,04 mL de tampão do gel de empilhamento;
- filtrou-se em papel-filtro Whatman 44ou equivalente;

- acrescentaram-se 10 µL de TEMED e 60 µL de persulfato de amônio.

Gel de separação

Os géis de separação foram preparados em diferentes concentrações, conforme as proporções de seus componentes. No Quadro 4, estão descritos os volumes empregados nas metodologias adotadas.

QUADRO 4 Preparação dos géis de separação em diferentes concentrações para procedimentos de UREA-PAGE

Componente	Gel a 7%	Gel a 8,5%	Gel a 10%
Acrilamida/Bis	6,3 mL	7,8 mL	9 mL
Tampão do gel de separação	31,25 mL	29,8 mL	28,5 mL

Quando do preparo das soluções de acrilamida, as quantidades adequadas da acrilamida/Bis e do tampão foram misturadas, conforme técnica descrita e a mistura filtrada em papel-filtro Whatman 44 ou equivalente, acrescentando, em seguida, TEMED e persulfato de amônio. Durante a filtração do gel de separação, procedeu-se à preparação da solução de persulfato de amônio e, durante a filtração do gel de empilhamento, o descarte da água destilada adicionada ao gel de separação e secagem do resíduo com papel-filtro, conforme metodologia geral descrita acima (item 3.3.2).

A fonte foi regulada, inicialmente, para a voltagem de corrida no gel de empilhamento (250 V) e para a amperagem de 200 mA (máximo), e acionada para iniciar a corrida. Quando o marcador de corrida (azul de bromofenol) ultrapassa a linha do gel de separação (cerca de 20 minutos depois), a voltagem

é ajustada para a de corrida no gel de separação, ou seja 280 V, mantendo-se a regulagem da amperagem e marcando 4:40 minutos no timer.

Para revelação das bandas nos géis, estes foram corados em solução de Comassie Blue R-250, por períodos de, no mínimo, 12 horas. O excesso de corante, quando necessário, era retirado com água destilada. Após revelação, os géis foram armazenados em solução de glicerol 10% v/v, adicionada de cerca de 50 mL de metanol ou solução fixadora dos protocolos anteriores (em 500 mL de solução de glicerol) no frasco de armazenamento.

3.4 Segunda etapa

3.4.1 Amostras

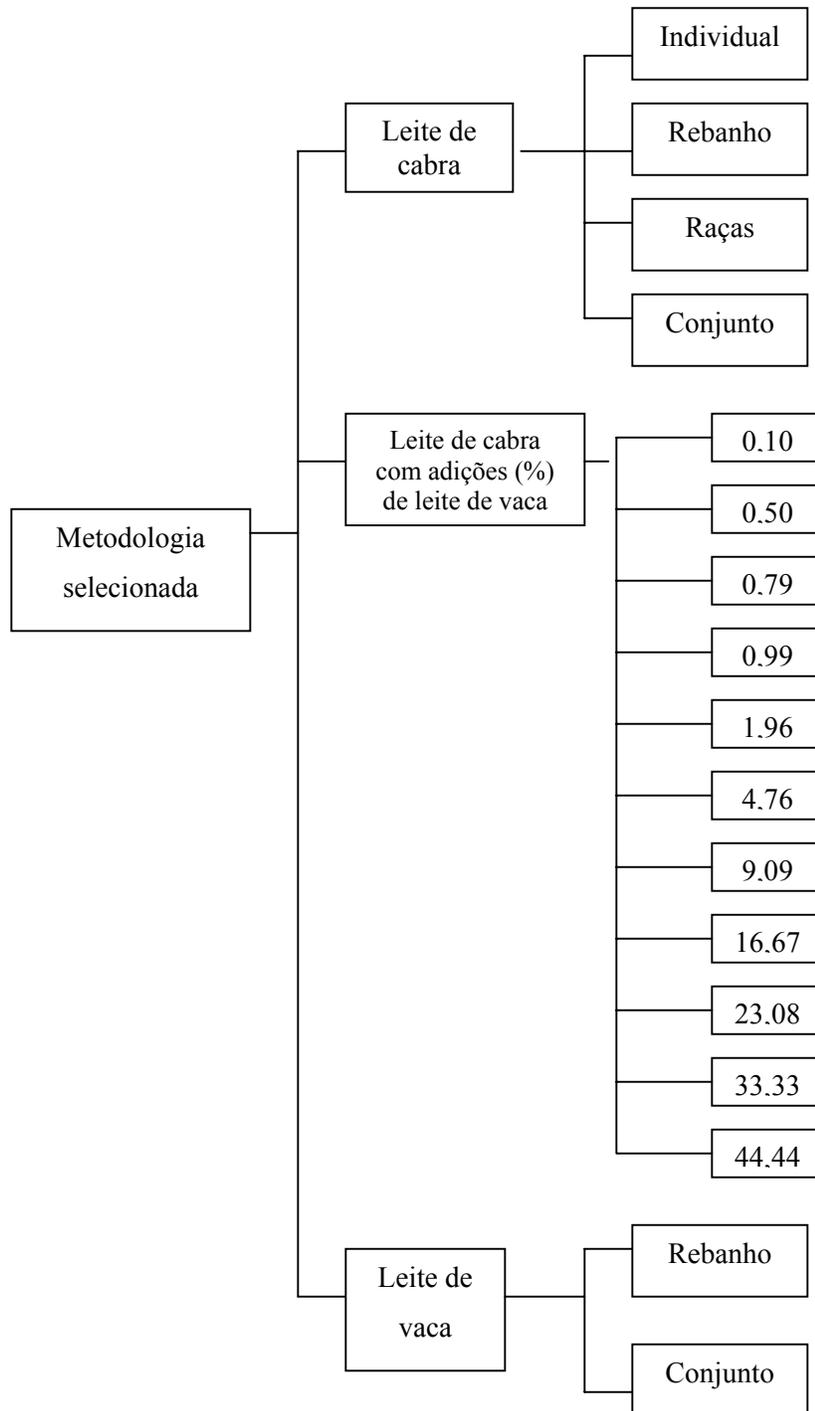
Foram coletadas amostras de leite de cabra de raças variadas (Saanen, Toggenburg, Parda Alpina, Parda Vermelha), durante a ordenha da manhã, de cabras individuais, em frascos de vidro com tampa e conservadas a frio (em banho de gelo, e posteriormente em geladeira) até o momento da preparação para análise. Foram coletadas três amostras por propriedade, totalizando nove amostras individuais. As coletas foram acompanhadas pela analista, garantido sua genuinidade.

As coletas de leite de vaca compuseram 4 ou 6 de amostras de conjunto, enviadas pelos produtores, trazidas no caminhão de coleta a granel e conservadas sob refrigeração até o momento da preparação para análise.

A preparação das amostras envolveu a seleção das mesmas. Foram separadas as amostras individuais das cabras e preparadas amostras de conjunto, com quantidades iguais de cada amostra individual, representando as propriedades visitadas, as raças e uma amostra de conjunto total (misturando partes iguais de todas as amostras individuais). Quanto ao leite de vaca, também foram separadas amostras compostas pelo leite de cada produtor, e uma amostra de conjunto, misturando partes iguais das amostras de cada um dos produtores.

Foram feitas adições de leite de vaca ao leite de cabra. A 1 mL de leite de cabra (amostra de conjunto, ou seja, mistura de partes iguais dos leites de cada animal coletado) foram adicionados, com auxílio de microsseringa tipo Hamilton Co. (Reno, Nevada), capacidade para 100 μ L e precisão de 1 μ L, leite de vaca nas seguintes quantidades: 0,001; 0,005; 0,008; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 0,8 mL (também amostra de conjunto, composta por volumes iguais das amostras provenientes de cada produtor). Os percentuais de adição correspondentes são, respectivamente, 0,10; 0,50; 0,79; 0,99; 1,96; 4,76; 9,09; 16,67; 23,08; 33,33; 44,44.

O Fluxograma 2 sumariza o planejamento experimental, descrevendo as amostras analisadas pelo método UREA-PAGE.



Fluxograma 2 Diagrama do planejamento experimental, segunda etapa

3.4.2 Padrões utilizados

Marcadores de peso molecular (LMW calibration kit for SDS eletrophoresis) da Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England)) e padrões de caseína (α -caseína, β -caseína e κ -caseína de leite bovino) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) também foram aplicados, respectivamente nos penúltimos poços de cada lado e nos poços centrais dos géis. Além disso, nos poços mais externos foram aplicadas amostras em branco, contendo exclusivamente tampão da amostra submetido ao mesmo tratamento (aquecimento e centrifugação) que as amostras preparadas.

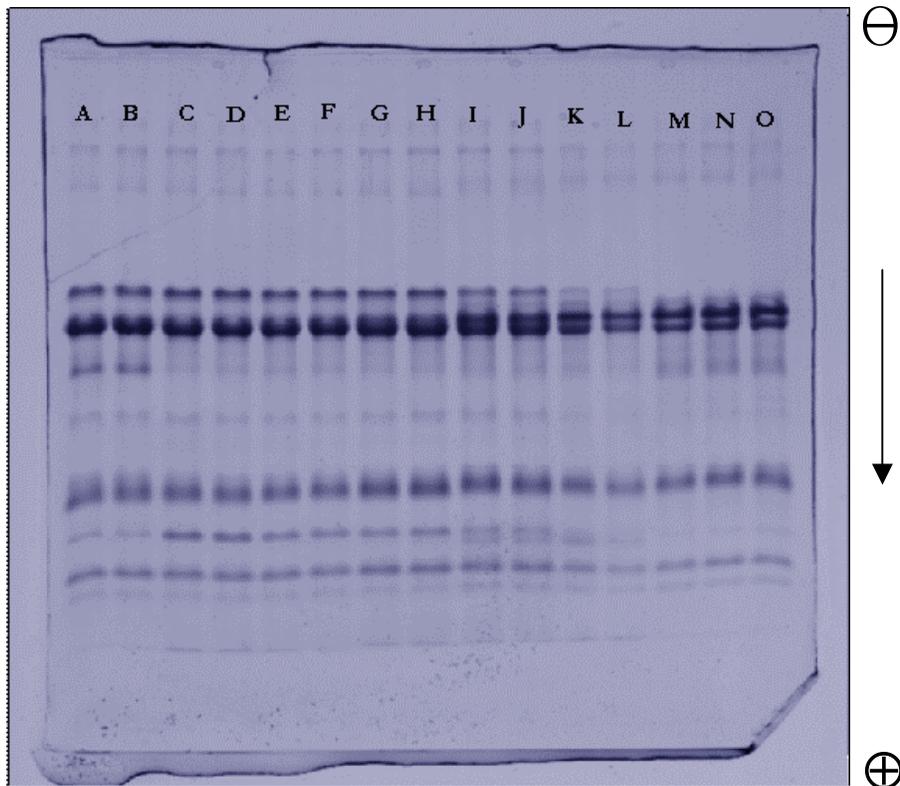
A preparação dos padrões foi feita da seguinte forma: o conteúdo dos frascos (576 μ g) dos marcadores de peso molecular foi diluído em 200 μ L de solução tampão de amostra e os padrões de caseína foram preparados pela dissolução de 1 a 2 mg de padrão em 1 mL de tampão de amostra. A seguir, foram submetidos a aquecimento a 40°C por 1 hora, em banho-maria. O marcador de peso molecular é composto de fosforilase b (músculo de coelho), massa molecular 97.000, albumina (soro bovino), massa molecular 66.000, ovoalbumina (ovo branco de galinha) 45.000, anidrase carbônica (eritrócito bovino) 30.000, inibidor de tripsina (soja) 20.100 e α -lactoalbumina (leite bovino) 14.400. Os padrões de caseína contêm: α_s -caseína, aproximadamente 85%; no mínimo, 70% de proteínas (biureto); β -caseína, mínimo 90%, salt free e κ -caseína, mínimo 80%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das variações analíticas da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Os géis obtidos empregando-se a técnica native-PAGE alcançaram muito baixa resolução na separação das bandas eletroforéticas, tanto para leite de cabra quanto para leite de vaca, demonstrando, inclusive, perfis eletroforéticos muito diversos para as duplicatas analisadas, provavelmente devido à influência de impurezas. Dessa forma, não foram executadas avaliações densitométricas dos géis e a técnica não foi aplicada para amostras de leite de cabra adicionadas de leite de vaca.

Os géis obtidos pelas técnicas de SDS-PAGE e UREA-PAGE apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios preliminares, tendo sido avaliados comparativamente. As Figuras 1 a 6 ilustram os perfis eletroforéticos das amostras obtidos pela aplicação destas técnicas, apresentados em seus géis de corrida e respectivos densitogramas, com os dados da análise efetuada por meio do software do densitômetro. A Figura 7 agrupa os densitogramas das amostras de leite de cabra e vaca obtidos pelas técnicas SDS-PAGE e UREA-PAGE, para facilitar a comparação.



- A. Leite de cabra cru - duplicata 1
- B. Leite de cabra cru - duplicata 2
- C. Mistura 4% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- D. Mistura 4% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- E. Mistura 10% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- F. Mistura 10% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- G. Mistura 20% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- H. Mistura 20% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- I. Mistura 50% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- J. Mistura 50% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- K. Mistura 80% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- L. Mistura 80% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- M. Leite de vaca cru – triplicata 1
- N. Leite de vaca cru – triplicata 2
- O. Leite de vaca cru – triplicata 3

FIGURA 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) com SDS de amostras de leite de cabra, leite de cabra com adições de leite de vaca e leite de vaca.

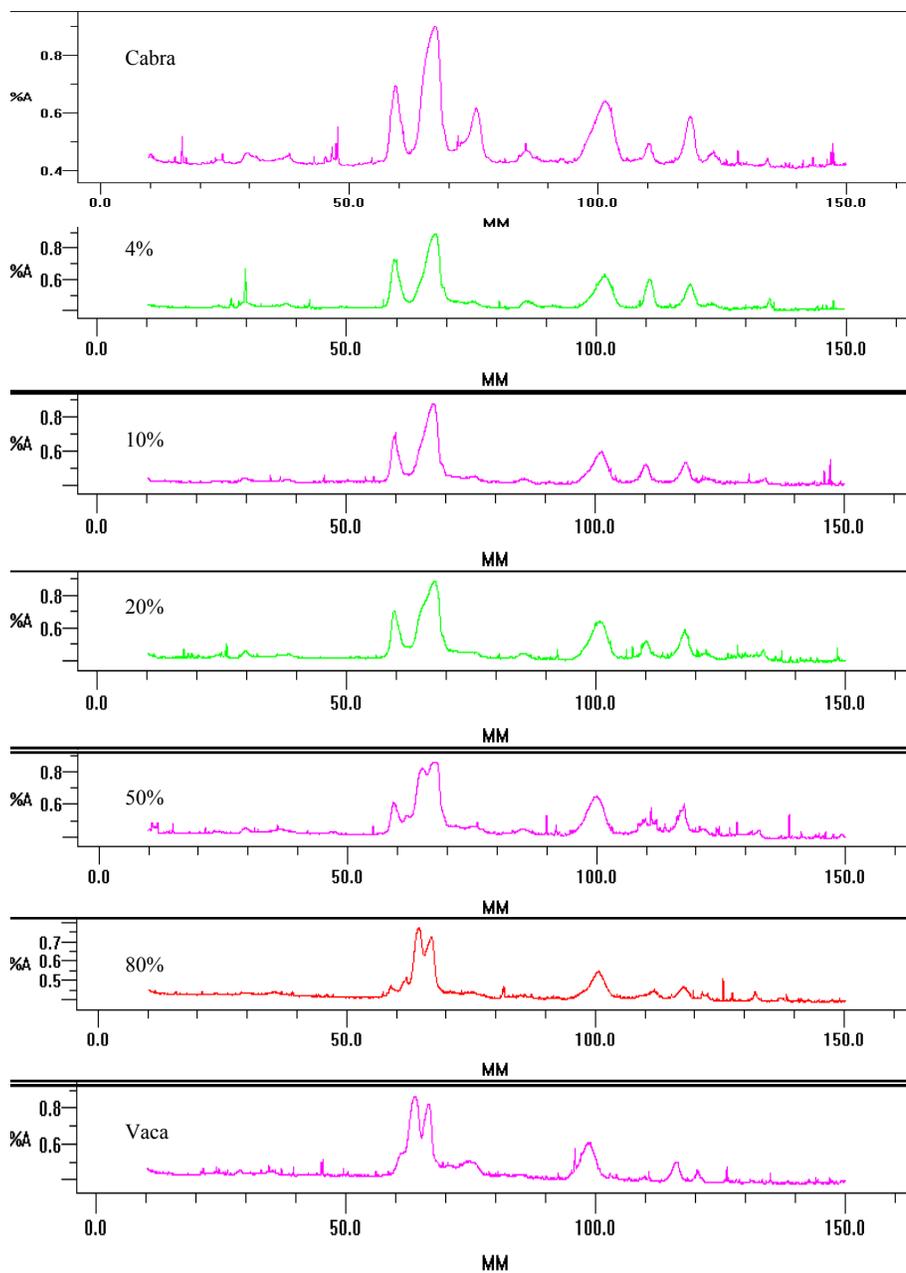
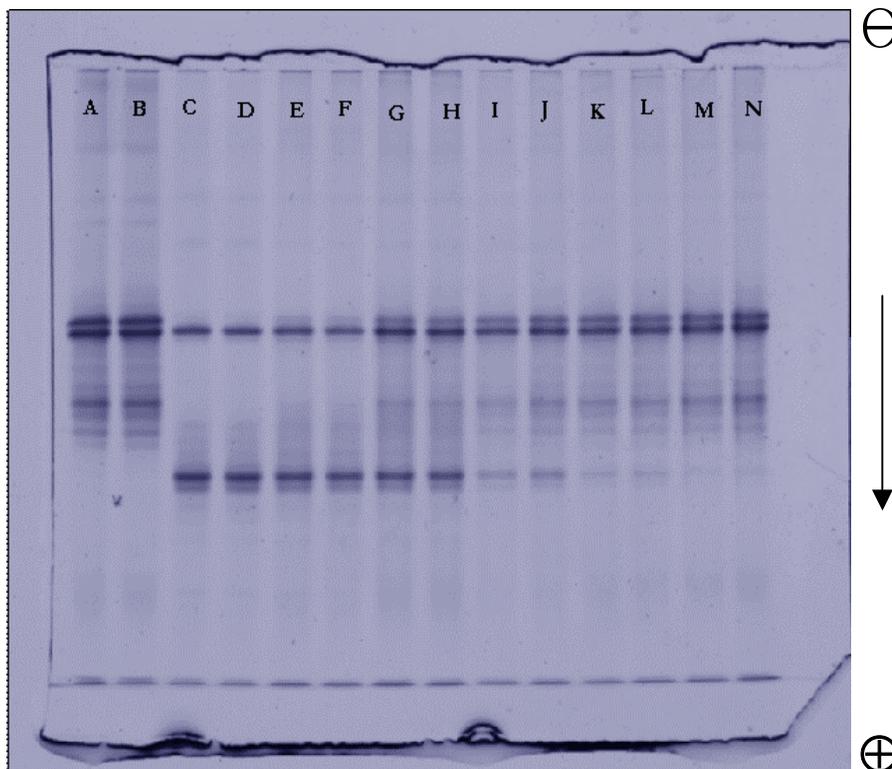


FIGURA 2 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (15%) pela técnica SDS-PAGE de amostras de leite de cabra, leite de cabra com adições (%) de leite de vaca e leite de vaca.



- A. Leite de cabra cru – duplicata 1
- B. Leite de cabra cru – duplicata 2
- C. Leite de vaca cru – duplicata 1
- D. Leite de vaca cru – duplicata 2
- E. Mistura 80% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- F. Mistura 80% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- G. Mistura 50% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- H. Mistura 50% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- I. Mistura 20% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- J. Mistura 20% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- K. Mistura 10% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- L. Mistura 10% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- M. Mistura 4% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- N. Mistura 4% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2

FIGURA 3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) com uréia de amostras de leite de cabra, leite de cabra com adições de leite de vaca e leite de vaca.

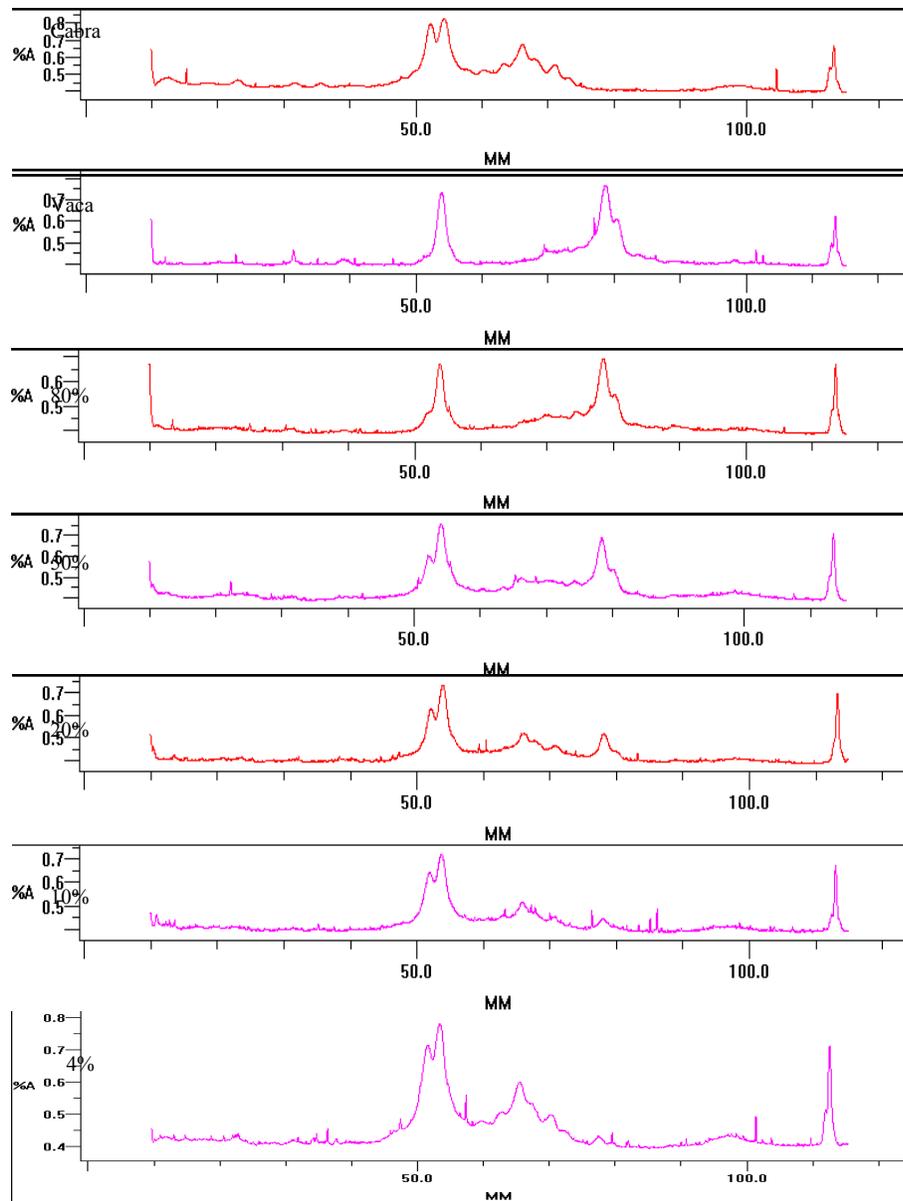
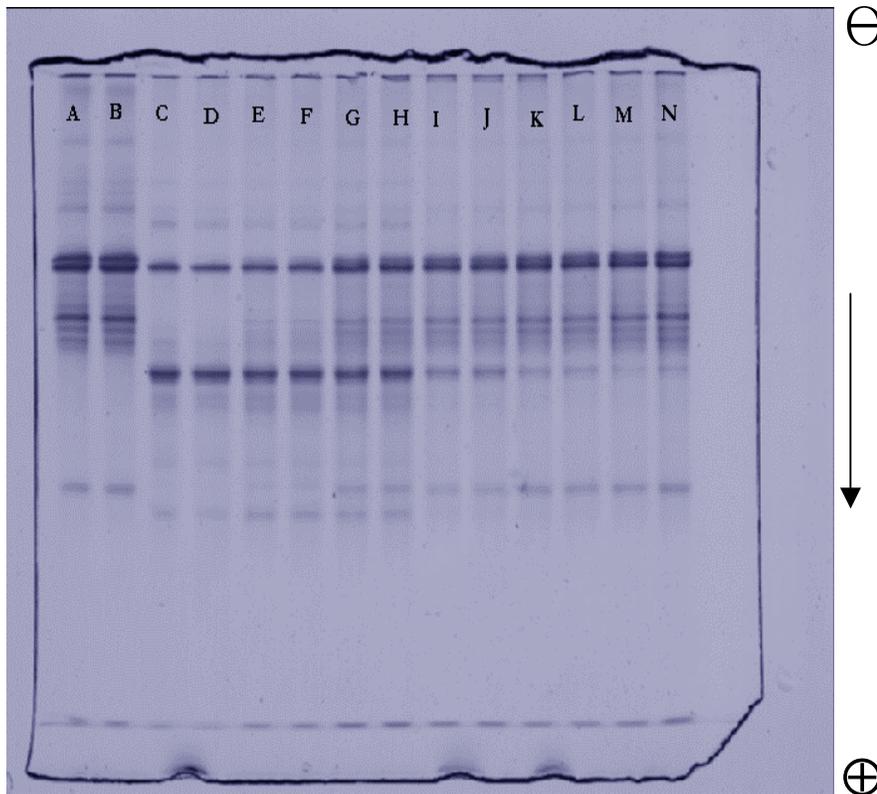


FIGURA 4 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (7%) pela técnica UREA-PAGE de amostras de leite de cabra, leite de vaca e leite de cabra com adições (%) de leite de vaca.



- A. Leite de cabra cru – duplicata 1
- B. Leite de cabra cru – duplicata 2
- C. Leite de vaca cru – duplicata 1
- D. Leite de vaca cru – duplicata 2
- E. Mistura 80% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- F. Mistura 80% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- G. Mistura 50% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- H. Mistura 50% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- I. Mistura 20% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- J. Mistura 20% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- K. Mistura 10% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- L. Mistura 10% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2
- M. Mistura 4% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 1
- N. Mistura 4% de leite de vaca ao leite de cabra - duplicata 2

FIGURA 5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de leite de cabra, cabra com adições de vaca e vaca.

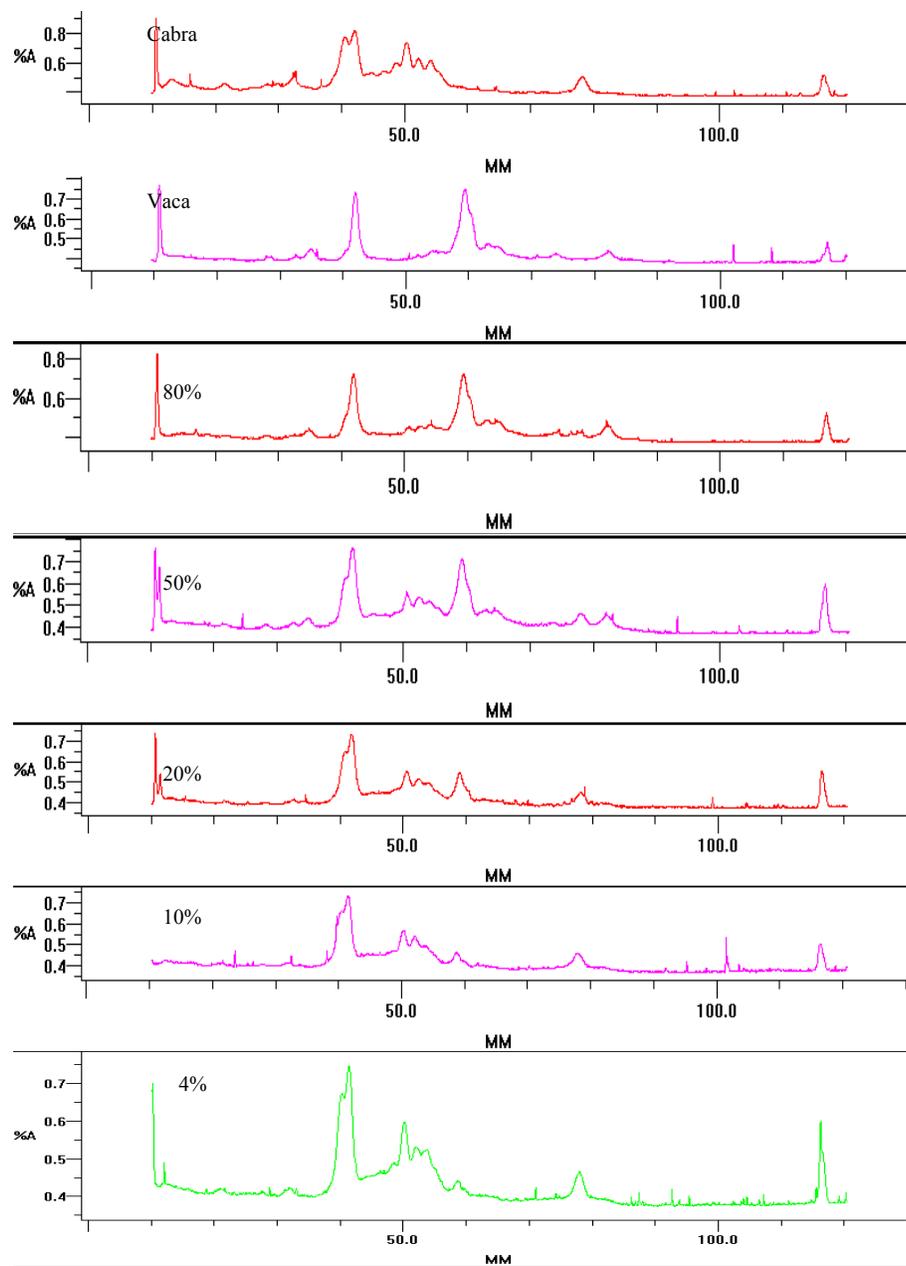


FIGURA 6 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE de amostras de leite de cabra, leite de vaca e leite de cabra com adições (%) de leite de vaca.

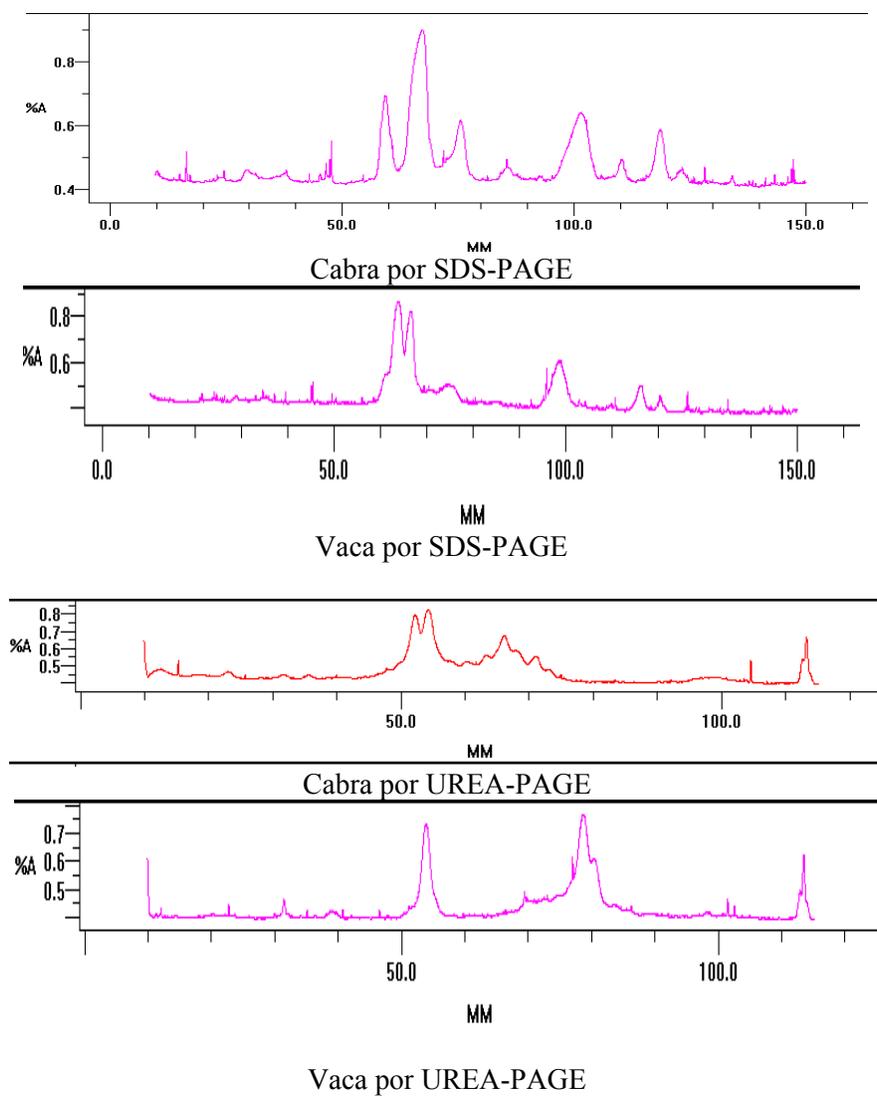


FIGURA 7 Comparação dos densitogramas obtidos para leite de cabra e leite de vaca pelas técnicas SDS-PAGE e UREA-PAGE.

A mobilidade eletroforética (posição das bandas protéicas) das frações caseínicas obtidas na Figura 1 depende exclusivamente de suas massas moleculares. Isso porque representa os perfis eletroforéticos das amostras de leite de cabra, de vaca e misturas, obtidos em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, ou seja, com adição de SDS (dodecil sulfato de sódio, detergente aniônico).

Os perfis obtidos nestas condições podem ser avaliados levando-se em conta os dados da literatura sobre as massas moleculares e proporções médias das frações protéicas características dos leites de cabra e de vaca. Os poços A e B representam amostras genuínas de leite de cabra e as três bandas superiores correspondem, provavelmente, às frações β -CN (banda mais escura) e α -CN (α_{s1} e α_{s2} - CN). Já os poços M, N, O, nos quais foram injetadas triplicatas de amostras de leite de vaca genuíno, parecem demonstrar duas bandas principais relativas a α -CN e β -CN.

Para o leite de vaca, trabalhos conduzidos em condições similares (Basch et al., 1985; Strange et al., 1992) indicam que as frações caseínicas aparecem na seguinte ordem crescente de mobilidade eletroforética: α_{s2} , α_{s1} , β e κ - CN. Esta seqüência concorda com os valores médios das massas moleculares das frações e, considerando-se seus teores, as bandas coradas mais fortemente e, conseqüentemente, os maiores picos de absorção obtidos nos densitogramas, devem ser correspondentes a α_{s1} -CN, $(\beta + \kappa)$ -CN e α_{s2} -CN, nesta ordem.

De acordo com Basch et al. (1985), as massas moleculares das mais importantes frações caseínicas estão na faixa de 19 a 25000 kDa, mas, neste sistema, elas parecem migrar até faixa próxima ou abaixo (ou seja, migram mais) que a anidrase carbônica (massa molecular 30000 kDa), o que demonstra que as caseínas exibem comportamento anormal nestas condições. Isto pode ser justificado pela ligação em proporções variadas ao SDS pelas diferentes frações caseínicas ou pela interação entre as frações caseínicas separadas. Strange et al.

(1992) também destacam comportamentos anômalos das proteínas do leite em SDS-PAGE, destacando que foi observada mobilidade menor para α_{s1} -CN em relação à β -CN, que apresenta massa molecular pouco maior. Apesar de ambas ligarem-se à mesma quantidade de SDS, a α_{s1} -CN apresenta um tamanho inesperadamente grande.

Com relação ao leite de cabra, a banda que apresenta mais alta concentração refere-se ao somatório ($\beta + \kappa$)-CN e as frações α_{s1} e α_{s2} apresentam migrações específicas de acordo com suas variantes genéticas, conforme os trabalhos de Jaubert & Martin (1992).

Os poços C a L representam injeções de leite de cabra adicionado de percentuais crescentes de leite de vaca e observa-se uma transição gradual de perfil similar ao do leite de cabra até uma similaridade bem maior com o leite de vaca, à medida que o percentual de adição sobe de 4% para 80%. A avaliação comparativa dos densitogramas B (identificado como cabra, representando uma amostra genuína deste leite) e N (identificado como vaca, apresentando o perfil do leite de vaca) revela diferenças nos perfis eletroforéticos. Mas, a concentração dos picos numa mesma faixa de mobilidades relativas, ou seja, 6 picos entre 60 e 120 mm para o leite de cabra e 5 picos entre 60 e 120 mm para leite de vaca, fornece menor diferenciação entre os leites das duas espécies que aquela obtida avaliando os densitogramas das amostras analisadas pela técnica UREA-PAGE, como se pode observar nas Figuras 3 a 6 e ainda mais claramente na Figura 7. Além disso, o maior número de bandas no gel obtido pela técnica SDS-PAGE (Figura 1), se comparado com os géis da técnica UREA-PAGE (Figuras 3 e 5), bem como a identificação mais fácil das alterações obtidas nos perfis das misturas, considerando-se ordem crescente de adições de leite de vaca, indica ser esta última técnica mais apropriada e de avaliação menos complexa para detecção de leite de vaca adicionado ao de cabra.

Considerando-se as principais bandas obtidas nos poços A e B (leite de cabra) e C e D (leite de vaca), na Figura 3, observa-se que o leite de cabra apresenta, nesta ordem, β -CN, α_s -CN e o leite de vaca β -CN e α_{s1} -CN, como os picos mais expressivos. Os poços de E a N representam leite de cabra adicionado de porções decrescentes de leite de vaca (80% a 4%). Pode ser observada a transição gradual de 1 para 2 picos relativos à β -CN e o aumento na intensidade de cor da banda com mobilidade da α_s -CN de cabra, à medida que diminui o percentual de mistura, da mesma forma que a intensidade da banda referente à α_{s1} -CN do leite bovino se reduz no mesmo sentido. Isso pode ser comprovado pelas alturas (áreas) dos picos relativos obtidos nos densitogramas.

A comparação dos perfis eletroforéticos dos leites de cabra (poço B, identificado como cabra no densitograma) e de vaca (poço D, identificado como vaca no densitograma) indica a presença de um pico relativo à β -CN com mobilidade similar nas duas amostras. Mas, o pico do leite de cabra apresentando uma subdivisão que caracteriza os dois tipos desta proteína presentes no leite desta espécie, o que não se observa no leite de vaca, e as mobilidades das frações α são distintos, com picos característicos a uma distância menor no leite de cabra (60 a 75 mm para o poço B neste gel) e maior para o leite de vaca (próximo de 80 mm). Dessa forma, a distinção entre as amostras é facilitada, podendo ser efetuada, preferencialmente, pelo aparecimento ou não da banda com maior mobilidade, característica do leite de vaca, e que se apresenta em concentração crescente (área do pico crescente ou cor da banda mais intensa) em leite de cabra adicionado de quantidades também crescentes de leite de vaca.

Este fato, além da maior facilidade e rapidez de execução da técnica, permitiu selecionar o método UREA-PAGE como o mais adequado à detecção da adição de leite de vaca ao de cabra, apesar das intensidades de coloração obtidas por SDS serem mais fortes e a conservação dos géis em glicerol ser

favorecida (não há necessidade de utilização de substâncias com capacidade conservante). As Figuras 3 e 6 representam os géis de uréia com diferentes concentrações de poliacrilamida. A injeção das mesmas amostras e a realização das corridas em ambos os géis simultaneamente revelam apenas diferenças nos valores absolutos das distâncias, em mm, em que as bandas foram detectadas.

Segundo Horne & Parker (1982), a caseína do leite caprino apresenta menor intensidade de carga negativa que a bovina, mesmo com remoção do cálcio (indicado como responsável por esta menor intensidade de carga). Isso justifica a menor mobilidade das caseínas caprinas em relação às bovinas no gel de eletroforese em condições alcalinas. Destaca-se ainda que o componente de maior mobilidade eletroforética no leite caprino, designado α_{s2} -CN, representa uma proporção muito menos da caseína total que a α_{s1} -CN bovina.

Em gel alcalino, a β -CN migra em duas bandas, correspondentes a β_1 e β_2 – CN, que diferem no grau de fosforilação; as α_s -CN migram a frente da κ -CN, mas não são bem separadas em géis alcalinos, segundo o trabalho de Jaubert & Martin (1992).

A avaliação de amostras de leite de cabra de rebanho misto, pasteurizadas e de leite de vaca nas mesmas condições, após precipitação das caseínas, por eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (tampão pH 8,3), revela que as caseínas β do leite de cabra e de vaca possuem a mesma mobilidade eletroforética. Mas, a β -CN caprina é caracterizada por dois picos distintos, ao passo que somente um pico é visível na região da β -CN bovina. Estas duas β -CN foram descritas em outros experimentos e sua massa molecular determinada (24500), concluindo-se que ambas são similares a β -CN bovina com relação à carga elétrica e massa molecular.

A κ -CN caprina não apareceu no densitograma apresentado, tendo sido descrito na literatura que sua mobilidade é muito parecida com a da β -CN, nem

sempre aparecendo em eletroforese em pH alcalino. As β -CN são o principal componente protéico do leite de cabra (81,9% dos picos, contra 16,9% para α_{s1} -CN). As quantidades no leite de vaca foram descritas como 42,13% e 54,4%, respectivamente (Furtado, 1983b; Ramos & Juárez, 1985; Szijarto & van de Voort, 1983).

Variações na mobilidade eletroforética, principalmente das frações α_{s1} e κ , têm sido detectadas quando comparados leite de cabra e de vaca por eletroforese (Furtado, 1983). A ausência, em leite de cabra, de qualquer componente com mobilidade eletroforética similar à da α_{s1} -CN bovina pode ser usada para detecção de adulteração de leite de cabra por leite de vaca, tendo sido demonstrado que, a partir de 1% de adição, já pode ser detectado por este método (Jenness, 1980).

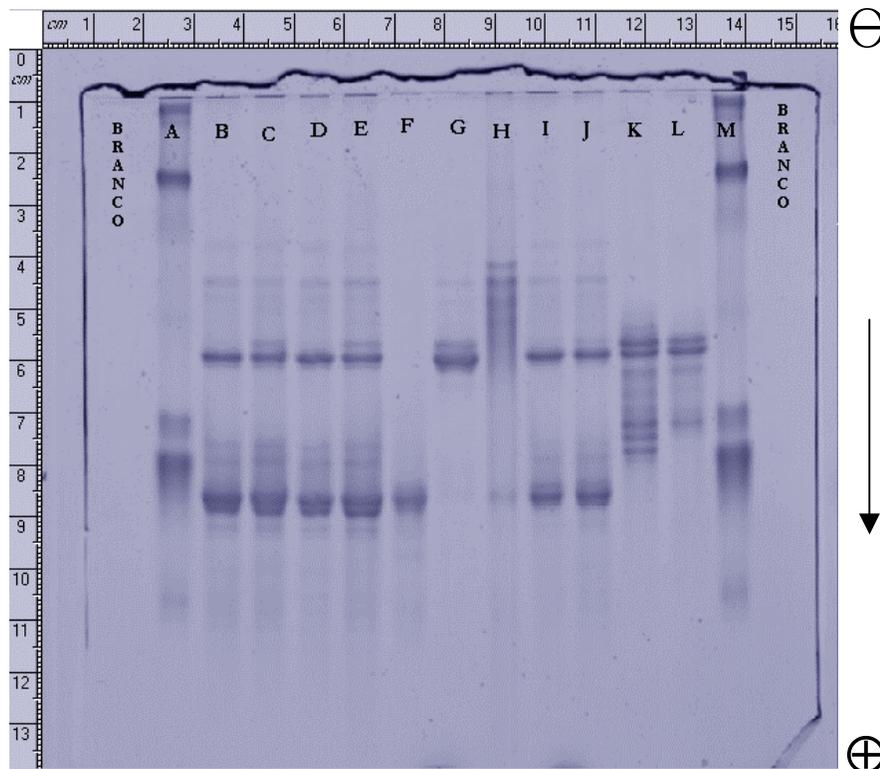
Praticamente todos os métodos eletroforéticos descritos para detectar misturas de leites se baseiam na maior mobilidade eletroforética no gel da α_{s1} -CN bovina em relação à caseína de maior mobilidade constituinte do leite de cabra, de forma que a presença desta fração se manifesta pela visualização de um pico à frente de todos os demais picos no densitograma de leite de cabra fraudado com leite de vaca, ausente no densitograma típico do leite de cabra genuíno. Esta é a mais óbvia diferença entre os perfis eletroforéticos de proteínas caprinas e bovinas e foi observada sobre gel de poliacrilamida e gel de amido, podendo detectar-se 1% de mistura com ambos os suportes, da mesma forma que em géis alcalinos contendo uréia. Bonassi (1987) admite que a adição de 5% a 10% de leite bovino ao caprino pode ser detectada pela presença da banda da α_{s1} -CN no gel eletroforético (Furtado, 1983a; Ramos & Juárez, 1985; Szijarto & van de Voort, 1983).

4.2 Avaliação do perfil eletroforético de amostras de leite de cabra e vaca pelo método UREA-PAGE

O método UREA-PAGE, selecionado em função dos resultados apresentados no item anterior, foi empregado para avaliação dos perfis eletroforéticos de diferentes amostras de leites de cabra e de vaca. O intuito foi o de detectar possíveis diferenças nestes perfis que comprometessem os resultados das detecções de fraudes. Foram avaliadas amostras de leite de vaca de diferentes produtores. Quanto ao leite de cabra, as amostras foram compostas de leites individuais, de diferentes raças e de diferentes propriedades (criatórios). As amostras foram consideradas genuínas em virtude do acompanhamento da coleta.

Foram injetados também padrões de caseína bovina (α -CN, β -CN e κ -CN) e de peso molecular para orientação na avaliação dos resultados, e amostras em branco (somente o tampão da amostra, submetido ao mesmo tratamento dado às amostras) para detecção de possíveis interferentes analíticos.

Os géis obtidos, bem como os respectivos densitogramas, são apresentados nas Figuras 8 a 15, nas quais foi mantida a escala de uma régua lateral para melhor avaliação das distâncias percorridas pelas bandas, ou seja, das mobilidades das frações protéicas estudadas.



- A. Padrão de peso molecular
- B. Amostra de leite de vaca - produtor 1
- C. Amostra de leite de vaca - produtor 2
- D. Amostra de leite de vaca - produtor 3
- E. Amostra de leite de vaca - produtor 4
- F. Padrão de α -caseína bovina
- G. Padrão de β -caseína bovina
- H. Padrão de κ -caseína bovina
- I. Amostra de leite de vaca - produtor 5
- J. Amostra de leite de vaca - produtor 6
- K. Amostra de leite de cabra 1
- L. Amostra de leite de cabra 2
- M. Padrão de peso molecular

FIGURA 8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de leite de vaca por produtor e leite de cabra individuais e padrões de α , β e κ -CN bovinas.

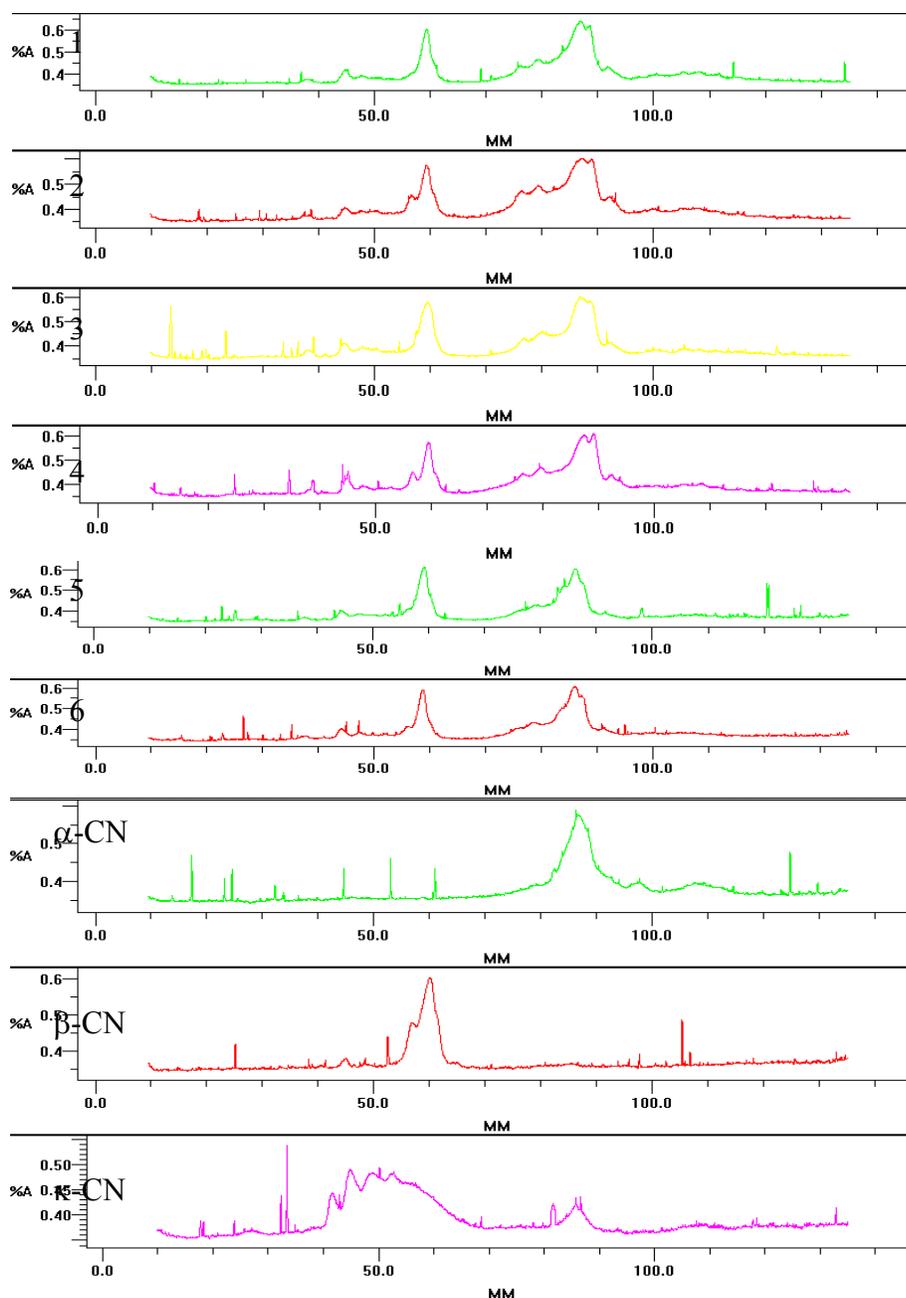


FIGURA 9 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de vaca de seis produtores e dos padrões de α , β e κ - CN bovinas.

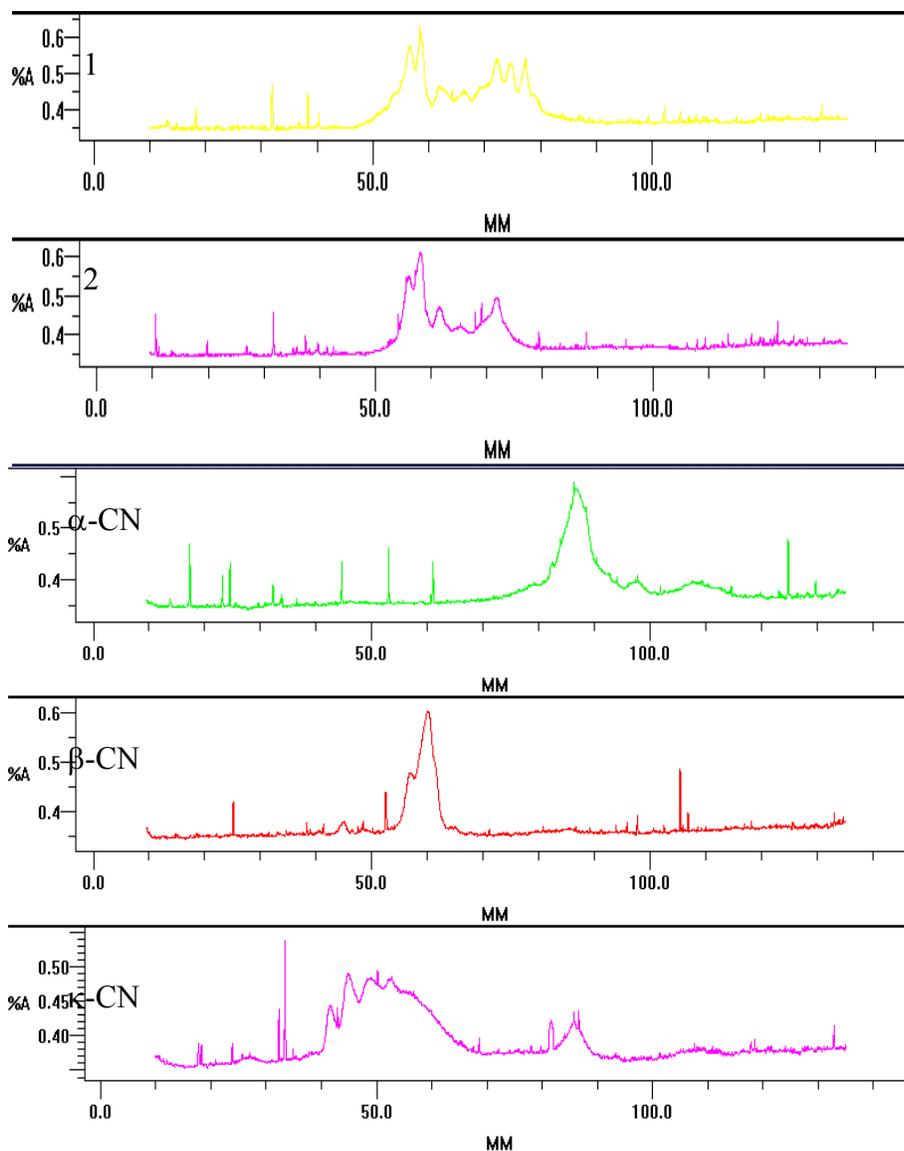
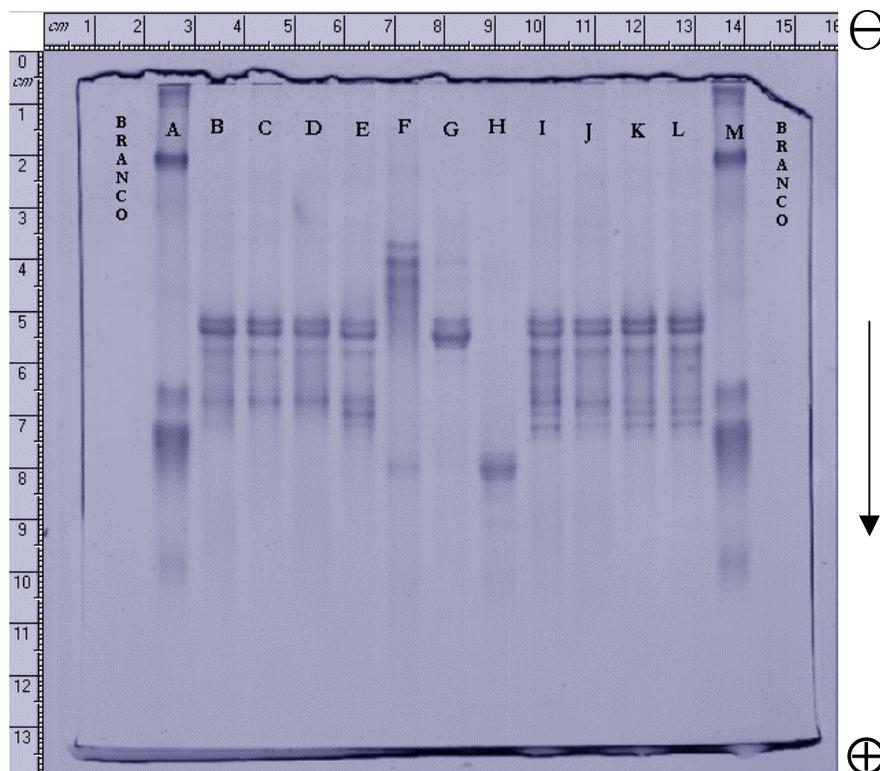


FIGURA 10 Densitogramas obtidos, a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra de dois animais e dos padrões de α , β e κ - CN bovinas.



- A. Padrão de peso molecular
- B. Amostra de leite de cabra 3
- C. Amostra de leite de cabra 4
- D. Amostra de leite de cabra 5
- E. Amostra de leite de cabra 6
- F. Padrão de κ -caseína bovina
- G. Padrão de β -caseína bovina
- H. Padrão de α -caseína bovina
- I. Amostra de leite de cabra 7
- J. Amostra de leite de cabra 8
- K. Amostra de leite de cabra 9
- L. Amostra de leite de cabra 9
- M. Padrão de peso molecular

FIGURA 11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras individuais de leites de cabra, e dos padrões de α , β e κ -CN bovinas.

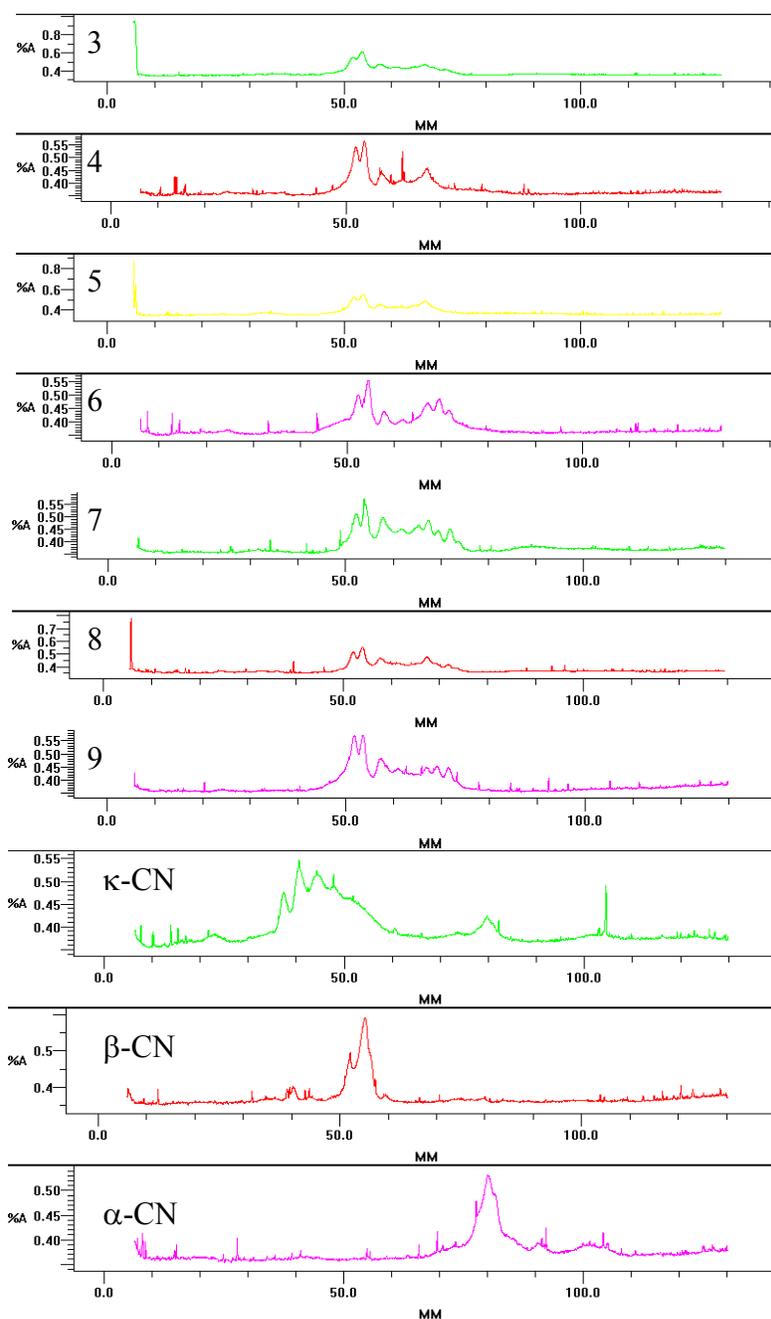
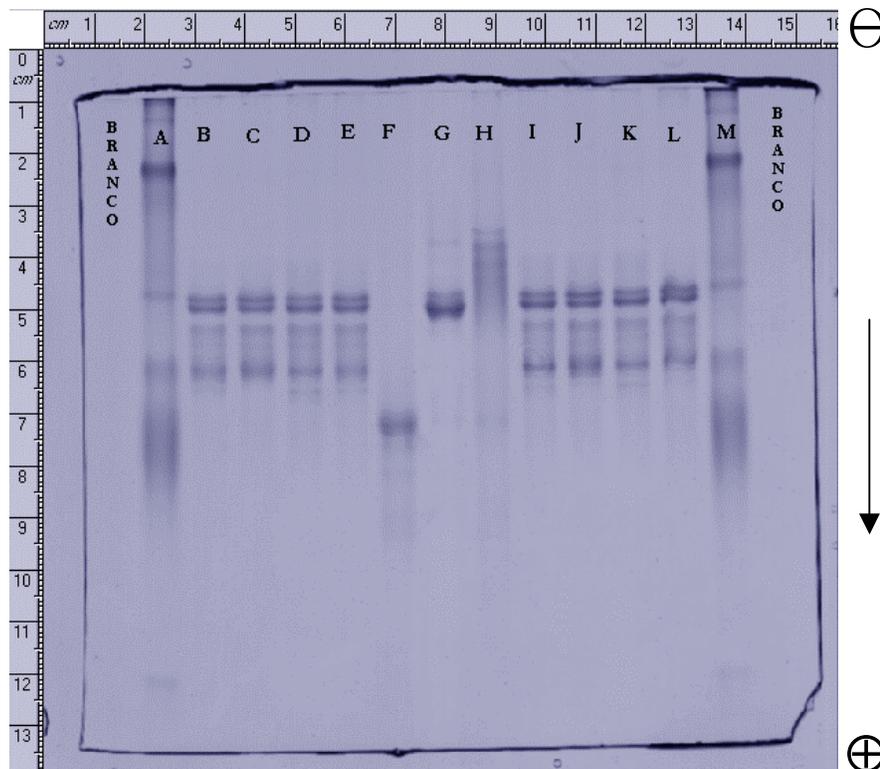


FIGURA 12 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra de sete animais e dos padrões de α , β e κ -CN bovinas.



- A. Padrão de peso molecular
- B. Amostra de leite de cabra proveniente da propriedade 1
- C. Amostra de leite de cabra proveniente da propriedade 2
- D. Amostra de leite de cabra proveniente da propriedade 3
- E. Amostra de leite de cabra da raça 1
- F. Padrão de α -caseína bovina
- G. Padrão de β -caseína bovina
- H. Padrão de κ -caseína bovina
- I. Amostra de leite de cabra da raça 2
- J. Amostra de leite de cabra da raça 3
- K. Amostra de leite de cabra da raça 4
- L. Amostra de leite de cabra de conjunto (raças e propriedades)
- M. Padrão de peso molecular

FIGURA 13 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de leite de cabra por propriedade e raça, e leite de conjunto e de padrões de α , β e κ - CN bovinas.

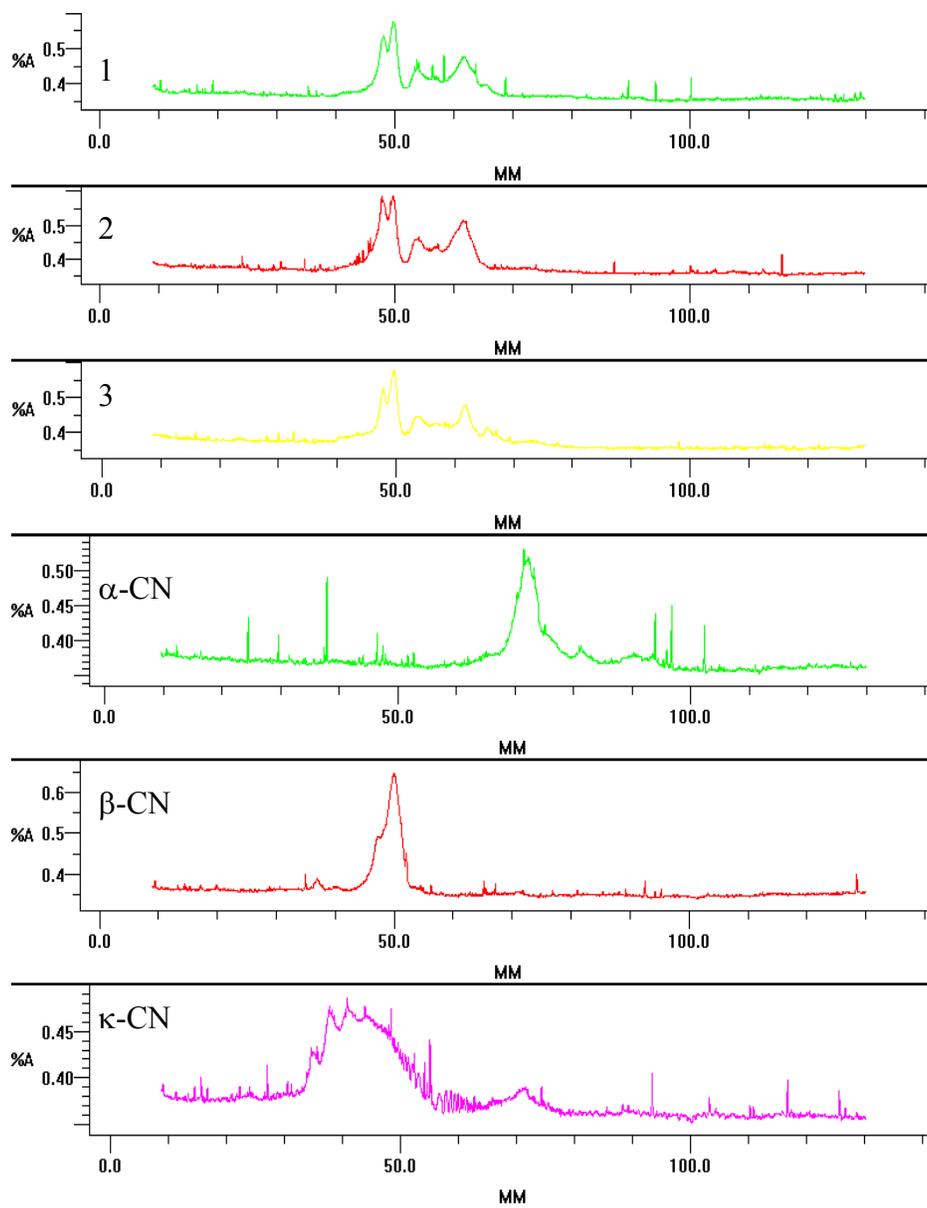


FIGURA 14 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra de três criatórios e dos padrões de α , β e κ - CN bovinas.

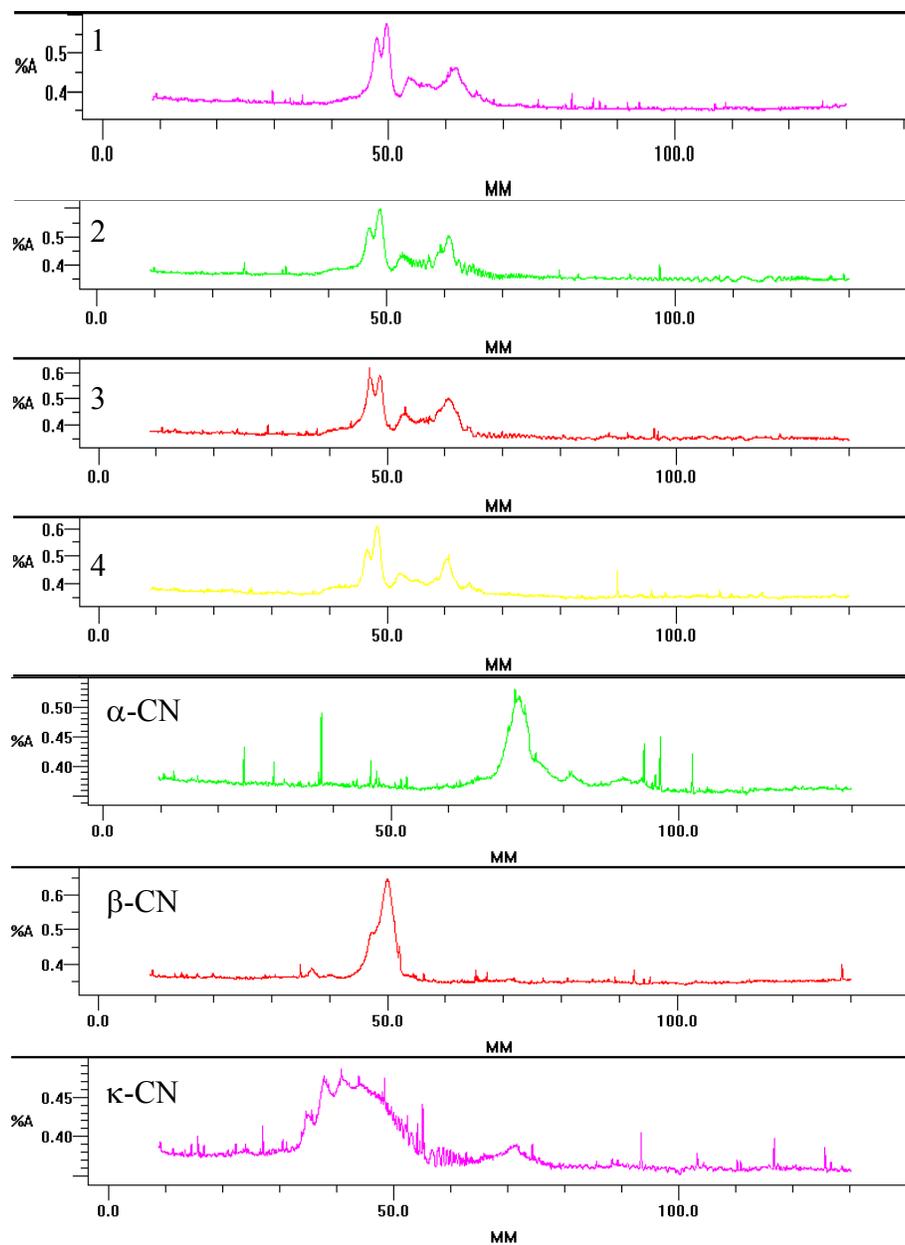


FIGURA 15 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra de quatro raças diversas e dos padrões de α , β e κ - CN bovinas.

A avaliação destes resultados mostra que os perfis das amostras de leite de vaca apresentaram algumas variações. Entretanto, estas não foram verificadas nas frações protéicas mais marcantes, em termos de teor e aplicabilidade para avaliação das adições ao leite de cabra. Assim, avaliando-se os perfis obtidos e seus densitogramas (Figuras 8 e 9), observa-se que as bandas relativas à β -CN (primeira banda escura, localizada próximo de 6 cm na Figura 8) e à α_s -CN (próxima de 9 cm, caracterizada por duas bandas, na mesma Figura) aparecem em todas as amostras analisadas, embora sejam notadas algumas diferenças, particularmente na intensidade, em outras frações protéicas, por exemplo localizadas logo acima da β -CN e da α_s -CN.

Quanto às amostras de leite de cabra avaliadas, observa-se a presença das frações principais, ou seja, da β -CN, constituindo-se dos dois picos característicos e da fração de maior mobilidade (α_s -CN) em todas as amostras analisadas. Entretanto, observam-se claramente as diferenças quanto ao número de bandas componentes desta fração de maior mobilidade.

O componente de maior mobilidade (mais rápido) da caseína caprina na eletroforese em sistemas alcalinos representa uma proporção muito menor da caseína total que a α_{s1} -caseína bovina. Apesar da falta de dados na literatura sobre amostras individuais de leite de cabra, parece haver completa carência de α_{s1} caseína no leite de cabra. Já foram detectadas duas formas polimórficas de α_s -caseína em exames eletroforéticos de amostras de leite de cabra. Utilizando-se a determinação pelos grupos terminais específicos, encontrou-se que menos de 25% da caseína caprina são do componente α_{s1} (Jenness, 1980). Jaubert (1992) cita que o teor de caseína α_{s1} varia, segundo alguns experimentos, de 0% (20% das 400 amostras analisadas) a 18,8% das caseínas caprinas. Esta é, provavelmente, a causa destas variações observadas nos perfis protéicos do leite de cabra.

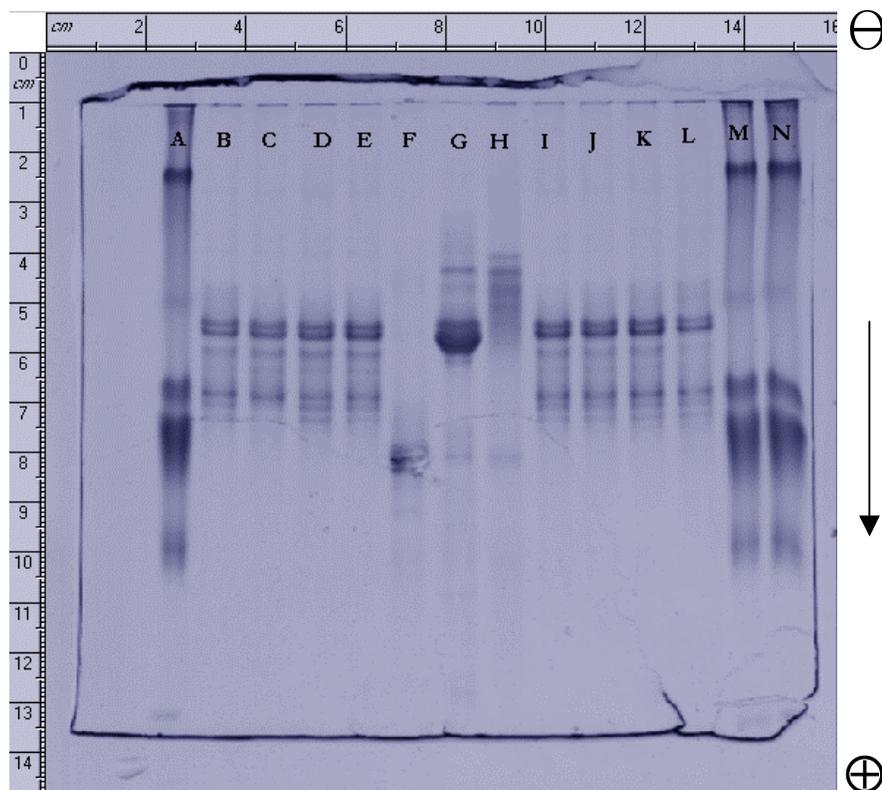
Entretanto, comparando-se os densitogramas de todas as amostras de leite de vaca com os padrões de caseína bovina, pode-se observar que, em nenhuma das amostras pesquisadas, apesar das variações observadas, houve coincidência de bandas de caseína caprina com a fração α_s -CN bovina. Dessa forma, a avaliação da presença ou ausência deste componente eletroforético para detecção de fraude de leite de cabra por adição de leite de vaca não está sujeita a variações em função das diferenças entre amostras individuais, ou de diferentes propriedades e raças, nas condições estudadas.

4.3 Avaliação de amostras de leite de cabra adicionadas de leite de vaca pela técnica UREA-PAGE

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

Foram injetados também padrões de caseína bovina (α -CN, β -CN e κ -CN) e de peso molecular para orientação na avaliação dos resultados e amostras em branco (somente o tampão da amostra, submetido ao mesmo tratamento dado às amostras) para detecção de possíveis interferentes analíticos.

Os géis obtidos, bem como os respectivos densitogramas, são apresentados nas Figuras 16 a 19, nas quais foi mantida a escala de uma régua lateral para melhor avaliação das distâncias percorridas pelas bandas, ou seja, das mobilidades das frações protéicas estudadas.



- A. Padrão de peso molecular
- B. Leite de cabra – propriedade 1
- C. Leite de cabra – propriedade 2
- D. Leite de cabra – propriedade 3
- E. Leite de cabra – amostra de conjunto
- F. Padrão de α -caseína bovina
- G. Padrão de β -caseína bovina
- H. Padrão de κ -caseína bovina
- I. Leite de cabra com adição de 0,10% de leite de vaca
- J. Leite de cabra com adição de 0,50% de leite de vaca
- K. Leite de cabra com adição de 0,79% de leite de vaca
- L. Leite de cabra com adição de 1,96% de leite de vaca
- M. Padrão de peso molecular
- N. Padrão de peso molecular

FIGURA 16 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de leite de cabra por propriedade, de conjunto e com adições de leite de vaca, e padrões de α , β e κ -CN bovinas.

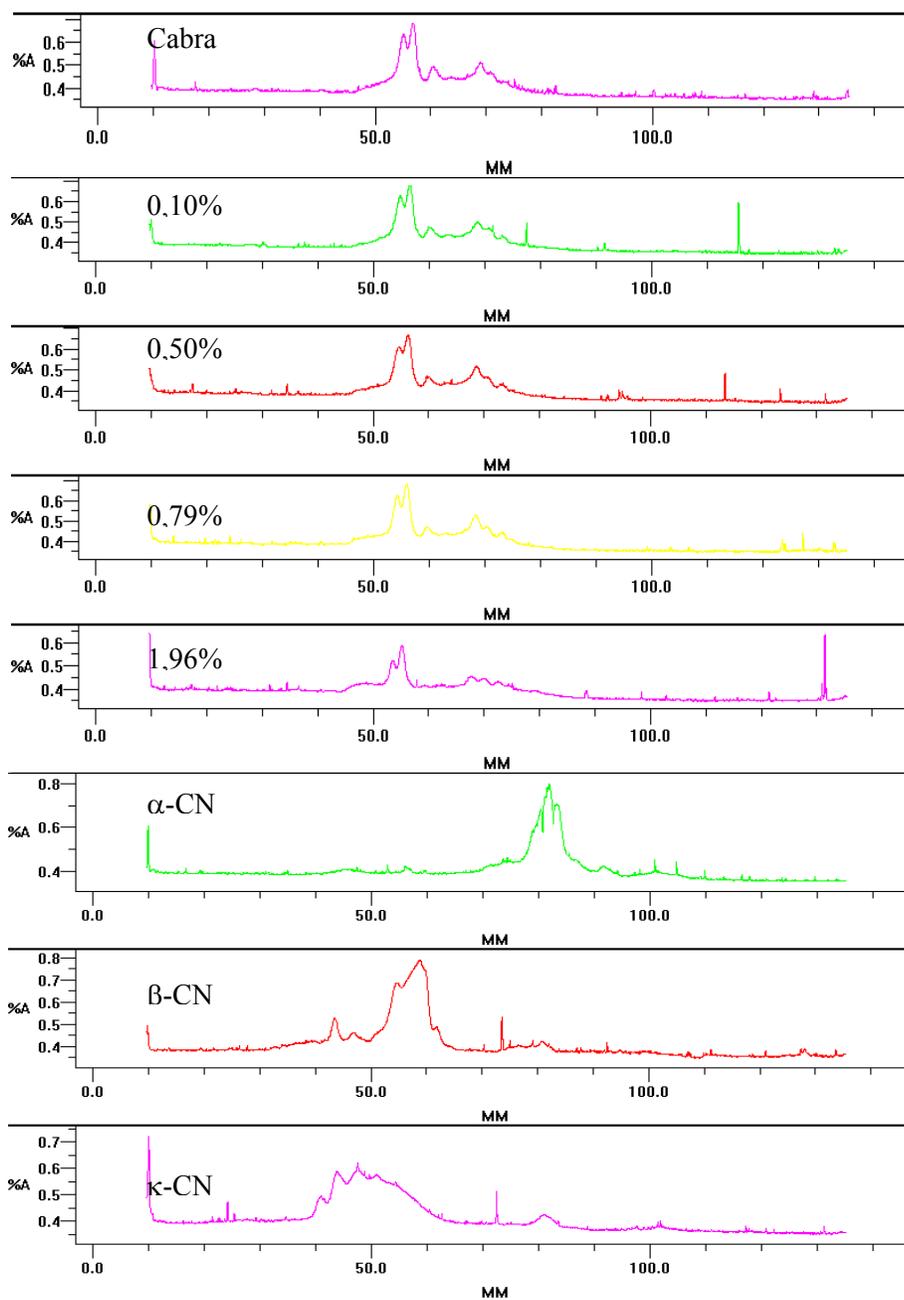
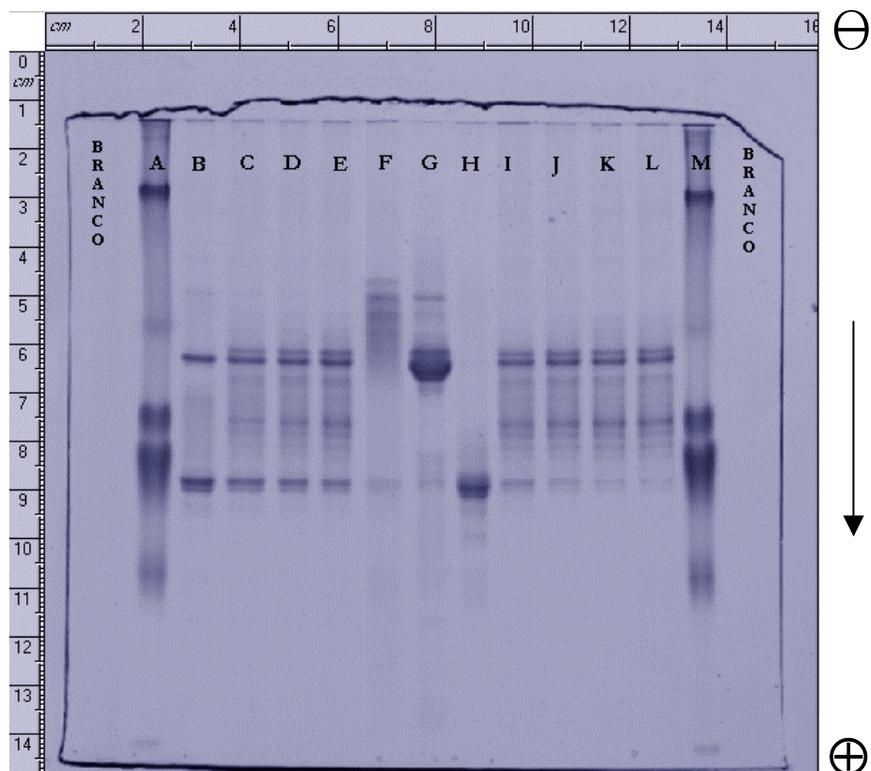


FIGURA 17 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra de conjunto e com adições (%) de leite de vaca, e padrões de α , β e κ - CN bovinas.



- A. Padrão de peso molecular
- B. Leite de vaca de conjunto
- C. Leite de cabra adicionado de 44,44% de leite de vaca
- D. Leite de cabra adicionado de 33,33% de leite de vaca
- E. Leite de cabra adicionado de 23,08% de leite de vaca
- F. Padrão de κ -caseína bovina
- G. Padrão de β -caseína bovina
- H. Padrão de α -caseína bovina
- I. Leite de cabra adicionado de 16,67% de leite de vaca
- J. Leite de cabra adicionado de 9,09% de leite de vaca
- K. Leite de cabra adicionado de 4,76% de leite de vaca
- L. Leite de cabra adicionado de 4,76% de leite de vaca
- M. Padrão de peso molecular

FIGURA 18 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de leite de vaca de conjunto, leite de cabra com adições de leite de vaca, e padrões de α , β e κ -CN bovinas.

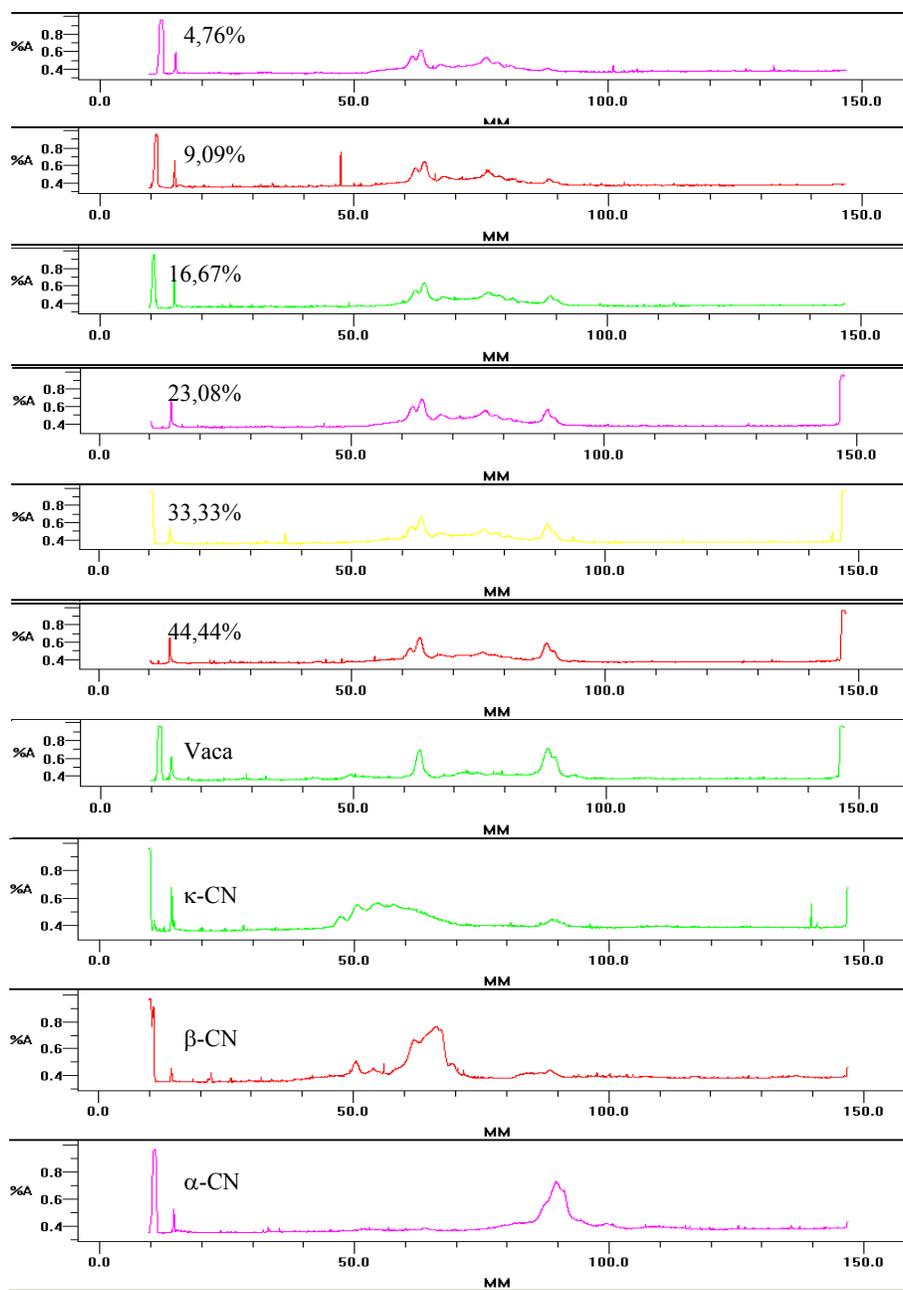


FIGURA 19 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras leite de cabra com adições (%) de leite de vaca, de leite de vaca, e padrões de α , β e κ - CN bovinas.

A observação dos géis e densitogramas apresentados permite indicar os perfis típicos de leite de cabra e leite de vaca, conforme citados no item 4.1. O perfil do leite de cabra mostra os picos de β -CN (subdividido em dois, em função dos dois tipos desta fração protéica que apresenta) e de α_s -CN (com algumas subdivisões, caracterizando os tipos α_{s1} e α_{s2} , porém, com mobilidade menor que a fração α_{s1} -CN bovina). O do leite de vaca mostra a fração β -CN em posição similar à sua homóloga caprina, porém, constituída de uma única banda (ou pico sem subdivisão) e sua fração α_{s1} -CN bem à frente da α_s -CN caprina. A análise em conjunto dos padrões de caseína bovina permite confirmar a identificação das frações protéicas.

Ao avaliar as amostras de leite de cabra adicionadas de quantidades crescentes de leite de vaca, pôde-se observar a transição gradual de um perfil muito similar ao leite de cabra até o percentual de 1,96%. A partir daí, ocorre similaridade crescente com o leite de vaca, notada inicialmente pelo aparecimento de um pico característico na região da α_{s1} -CN bovina a partir de 4,76% de adição, que aumenta em função do percentual crescente de leite de vaca adicionado. No mesmo sentido, observa-se descaracterização (bandas de coloração menos expressiva no gel e picos com menor área nos densitogramas) do perfil do leite caprino.

A detecção de fraudes pela adição de leite de vaca ao de cabra pode ser então confirmada pelo aparecimento do pico característico da α_{s1} -CN bovina, em sua distância ou mobilidade eletroforética característica, a partir de 4,76% de adição, já que a diferença nas outras frações protéicas é bem menos expressiva.

Szijarto & van de Voort (1983) indicam que a mais óbvia diferença entre os leites de cabra e vaca na eletroforese em gel de poliacrilamida em pH alcalino (8,9) está na fração α_{s1} -CN, já que a homóloga bovina apresenta mobilidade eletroforética maior que a caprina. Destacam ainda o uso desta fração para

detectar adulterações a partir de 5% de adição, pelo aparecimento da banda característica de α_{s1} -CN bovina nas amostras caprinas avaliadas, indicando a possibilidade de detecção em níveis ainda mais baixos (1,5% de adição) pela injeção de maiores concentrações de amostra no gel de corrida.

Furtado (1983), em experimento conduzido em condições similares, indica que o perfil eletroforético do leite de cabra apresenta duas bandas fortes na região da β -CN, que totalizaram 81% da área total do densitograma obtido; a posição desta fração, quando analisadas amostras de leite de cabra com adições crescente de leite de vaca até 100% (ou seja, até leite de vaca genuíno), indica a mesma mobilidade. Este resultado foi confirmado por outros autores, tendo sido destacado que a massa molecular de cada uma das β -CN caprinas é de 24.500 kDa, assemelhando-se à homóloga bovina neste aspecto, bem como com relação à carga líquida. O percentual de β -CN detectado no leite de vaca foi de 42,13% da área total do densitograma. O autor também destaca a menor mobilidade eletroforética da fração α_{s1} -CN caprina em relação à bovina, que confirma os resultados obtidos por outros trabalhos citados. Essa fração, quando se compararam as amostras de leite de cabra e vaca, caracteriza a principal banda nesta região dos géis (e densitogramas) de ambas as amostras, mas, a proporção que representa é inferior no leite de cabra que no de vaca (16,9% contra 54,4%).

A ausência, no leite caprino, de qualquer componente com mobilidade da α_{s1} -CN bovina torna possível detectar adulteração de leite caprino com leite bovino. Entretanto, com adulteração crescente de 5% a 50%, uma banda frontal crescente com a mesma mobilidade da α_{s1} -CN bovina vai se tornando aparente e sua área é diretamente proporcional ao percentual de adição testado. Adições de 5% ou mais de leite bovino ao leite de cabra pasteurizado podem ser detectada pela avaliação da presença de α_{s1} -CN bovina por métodos eletroforéticos. Bonassi (1987) também admite que a adição de 5% a 10% de leite bovino ao

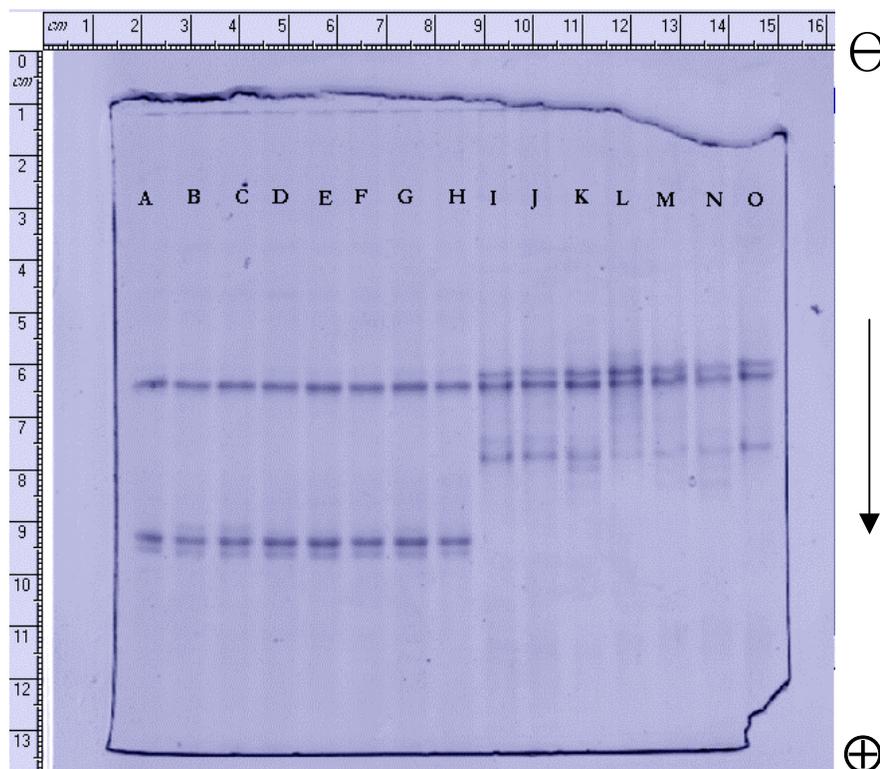
caprino pode ser detectada pela presença da banda da α_{s1} -CN no gel eletroforético.

4.4 Influência da conservação das amostras com Bronopol® e a frio, e dos processamentos – térmico e desidratação – sobre os perfis eletroforéticos obtidos

4.4.1 Conservação das amostras com Bronopol®

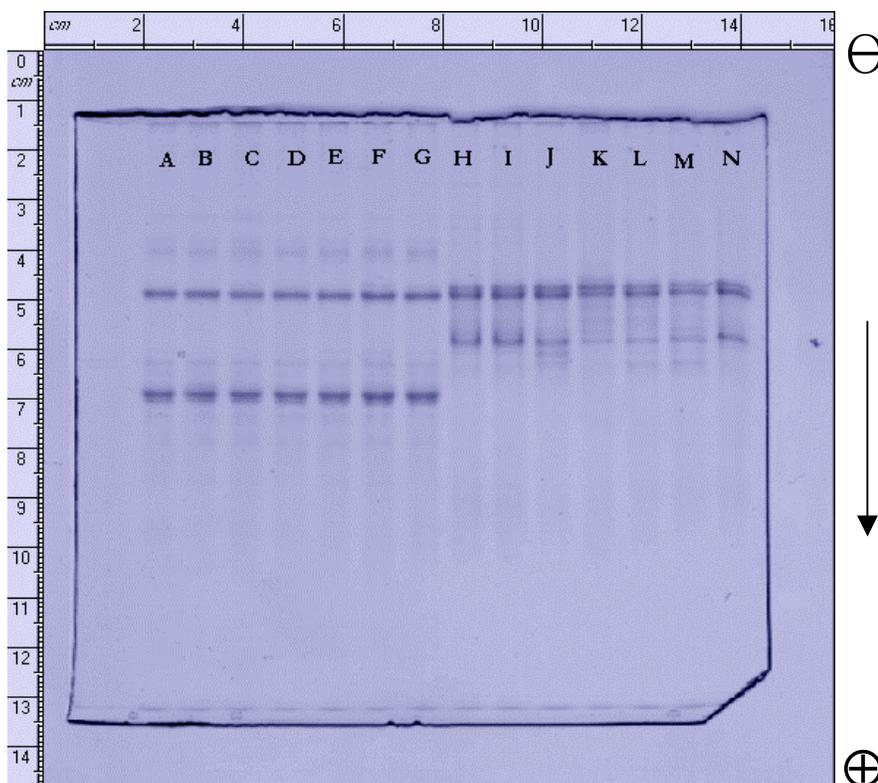
Foram avaliadas, simultaneamente, amostras de leite de cabra e de vaca conservadas com 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol®), com o objetivo de avaliar possíveis interferências dessa substância nos perfis eletroforéticos que pudessem comprometer os resultados analíticos. Esta substância foi avaliada em função de sua aplicação na conservação de amostras enviadas para análises, sobretudo instrumentais, em institutos de pesquisa localizados estrategicamente, além de ter seu uso recomendado pela American Public Health Association (APHA, 1992).

As Figuras 20 a 23 apresentam os perfis eletroforéticos obtidos em géis de corrida com diferentes concentrações de poliacrilamida e os respectivos densitogramas, nos quais foi mantida a escala de uma régua lateral para melhor avaliação das distâncias percorridas pelas bandas, ou seja, das mobilidades das frações protéicas estudadas.



- A. Leite de vaca cru – produtor 1
- B. Leite de vaca cru – produtor 2
- C. Leite de vaca cru – produtor 2
- D. Leite de vaca cru – produtor 3
- E. Leite de vaca cru – produtor 4
- F. Leite de vaca cru – produtor 5
- G. Leite de vaca cru – produtor 6
- H. Leite de vaca cru – produtor 6 adicionado de Bronopol®
- I. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 1 adicionado de Bronopol®
- J. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 1
- K. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 2
- L. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 3
- M. Leite de cabra cru – produtor 2/amostra 1
- N. Leite de cabra cru – produtor 2/amostra 2
- O. Leite de cabra cru – produtor 2/amostra 3

FIGURA 20 Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) com uréia de amostras de leite de vaca por produtor e de leite de cabra individuais, frescas e conservadas com Bronopol®.



- A. Leite de vaca cru – produtor 1
- B. Leite de vaca cru – produtor 2
- C. Leite de vaca cru – produtor 3
- D. Leite de vaca cru – produtor 4
- E. Leite de vaca cru – produtor 5
- F. Leite de vaca cru – produtor 6
- G. Leite de vaca cru – produtor 6 adicionado de Bronopol®
- H. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 1 adicionado de Bronopol®
- I. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 1
- J. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 2
- K. Leite de cabra cru – produtor 1/amostra 3
- L. Leite de cabra cru – produtor 2/amostra 1
- M. Leite de cabra cru – produtor 2/amostra 2
- N. Leite de cabra cru – produtor 2/amostra 3

FIGURA 21 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de leite de vaca por produtor e de leite de cabra individuais, frescas e conservadas com Bronopol®.

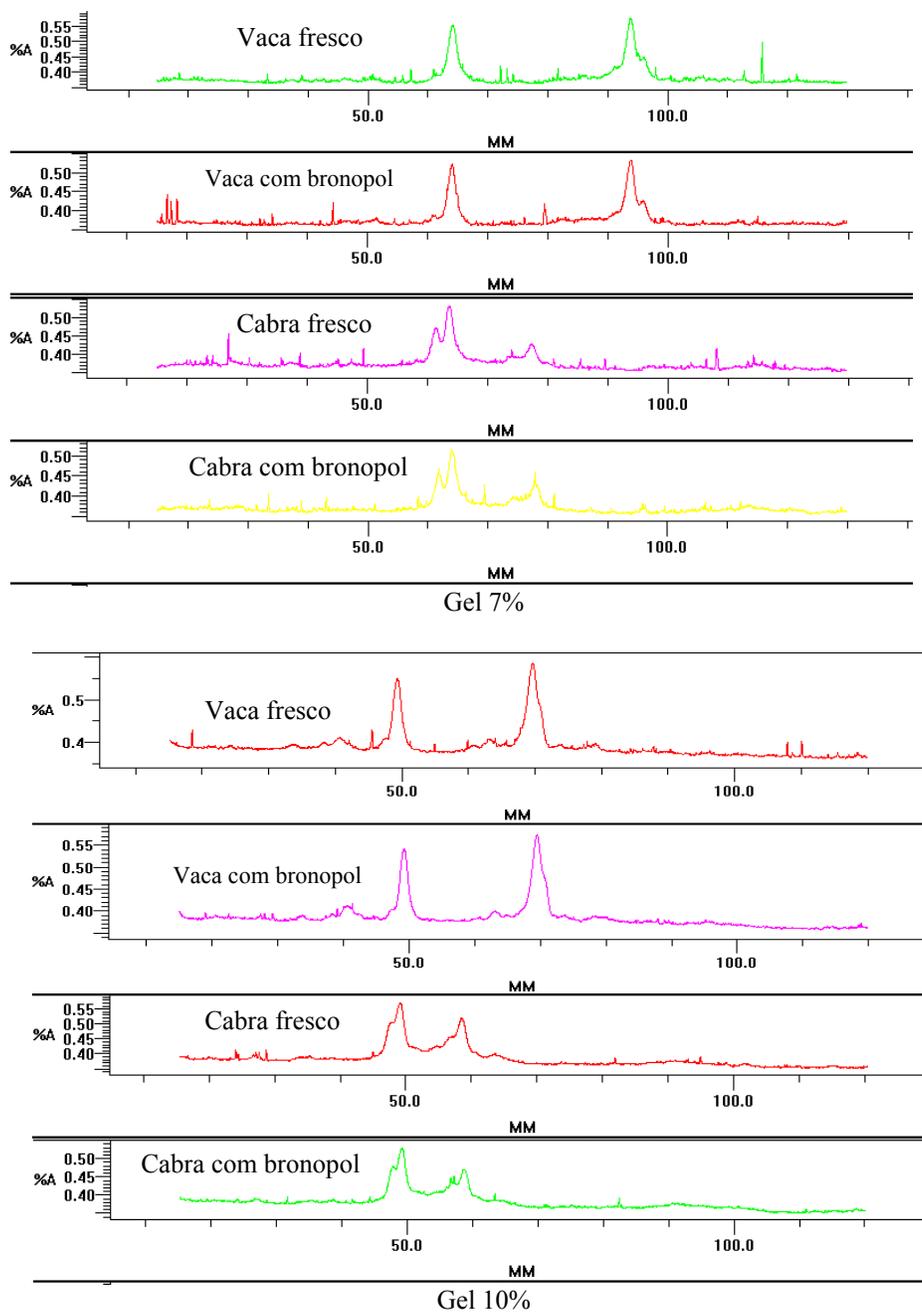


FIGURA 22 Densitogramas obtidos a partir dos géis de corrida (7% e 10%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras leite de vaca e de cabra, frescas e conservadas com Bronopol®.

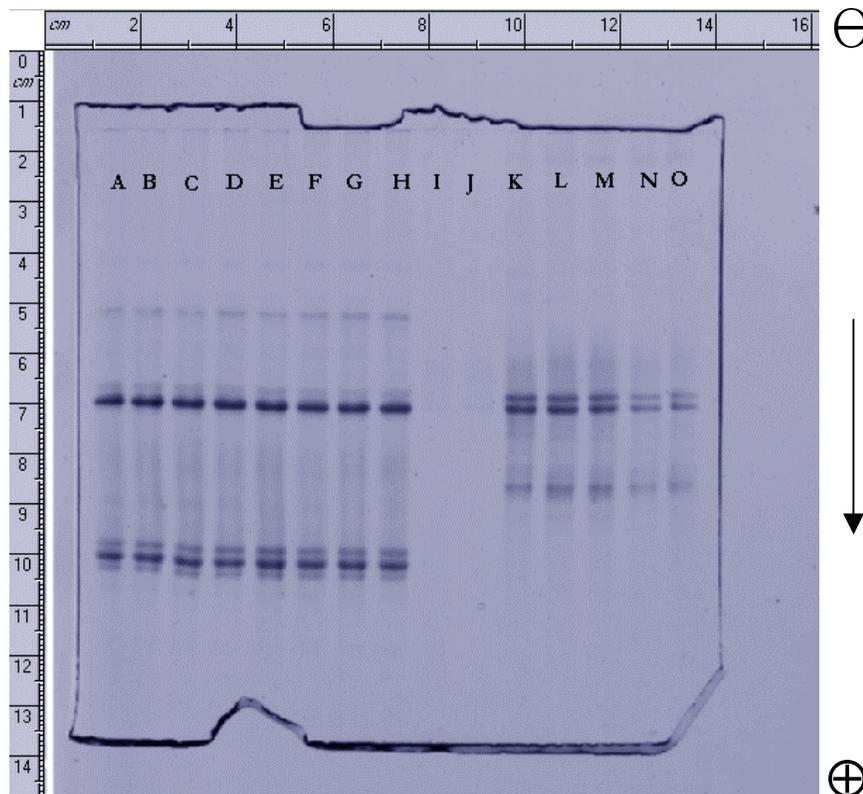
Comparando-se os perfis das amostras frescas e conservadas com Bronopol®, pode-se observar que os perfis mantêm-se rigorosamente sem alterações nas duas situações. As amostras de leite de vaca e de cabra empregadas foram as mesmas e os densitogramas demonstram as mesmas características descritas no item 4.2.

A avaliação dos géis em duas concentrações distintas apenas indica diferenças nos valores absolutos das distâncias percorridas por cada banda. Mas, a relação entre essas distâncias permanece constante, de forma que, mesmo considerando diferentes resoluções de separação, não foi detectada nenhuma alteração nos perfis eletroforéticos quando as amostras foram adicionadas deste conservante.

4.4.2 Conservação das amostras a frio

Foram avaliadas amostras de leite de cabra frescas e conservadas a frio (em geladeira por pelo menos 9 dias), com o objetivo de avaliar possíveis interferências dessa conservação nos perfis eletroforéticos que pudessem comprometer os resultados analíticos. Considerando-se que a técnica empregada pode ser influenciada por proteólise das caseínas, alterando seu comportamento eletroforético, deve-se ter em conta que a conservação a temperaturas baixas pode favorecer o desenvolvimento do grupo das bactérias psicrotróficas, produtoras de enzimas proteolíticas.

As Figuras 24 e 25 apresentam o gel de corrida e os respectivos densitogramas obtidos, nos quais foi mantida a escala de uma régua lateral para melhor avaliação das distâncias percorridas pelas bandas, ou seja, das mobilidades das frações protéicas estudadas.



- A. Leite de vaca – tanque comunitário 1
- B. Leite de vaca – tanque comunitário 1
- C. Leite de vaca – tanque comunitário 2
- D. Leite de vaca – tanque comunitário 3
- E. Leite de vaca – tanque comunitário 3
- F. Leite de vaca – tanque comunitário 4
- G. Leite de vaca – tanque comunitário 5
- H. Leite de vaca – tanque comunitário 5
- I. Leite de cabra – produtor 1, refrigerado por 9 dias
- J. Leite de cabra – produtor 1, refrigerado por 9 dias
- K. Leite de cabra – produtor 2, refrigerado por 9 dias
- L. Leite de cabra – produtor 2, refrigerado por 9 dias
- M. Leite de cabra – produtor 1, fresco
- N. Leite de cabra – produtor 1, fresco
- O. Leite de cabra – produtor 2, fresco

FIGURA 23 Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) com uréia de amostras de leite de vaca de cinco tanques de expansão comunitários, e de leite de cabra de dois produtores (refrigerado e fresco).

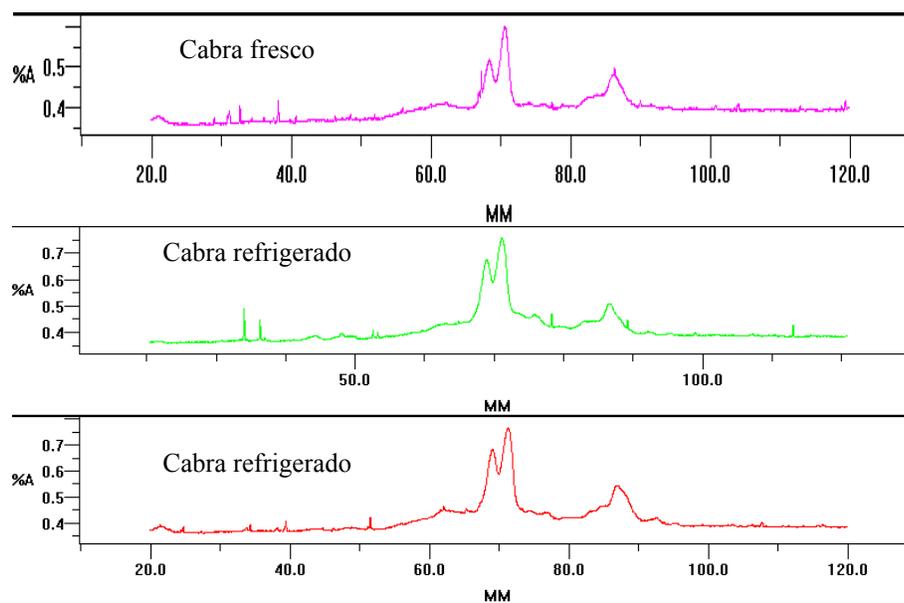


FIGURA 24 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (7%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra fresco e refrigerado.

A observação dos perfis eletroforéticos obtidos e respectivos densitogramas não demonstra diferenças quanto à posição das bandas protéicas da amostra analisada, seja fresca ou conservada a frio. Observa-se o mesmo padrão já descrito para leite de cabra (item 4.2), embora diferenças nas alturas dos picos possam ser detectadas.

Entretanto, a detecção de fraude de leite de cabra com leite de vaca não parece ser afetada por tratar-se de avaliação qualitativa dos densitogramas. Ou seja, a indicação da adição de leite de vaca ao de cabra se dá pela presença ou não de pico característico na região da fração α_{s1} -CN bovina, de forma que, ainda que a atividade proteolítica de microrganismos psicrotróficos (ou outros agentes) altere a concentração das frações protéicas originais e dê origem a resíduos de cadeias polipeptídicas menores, só haveria interferência na avaliação das fraudes se a alteração eliminasse totalmente a α_{s1} -CN bovina ou tornasse seu teor inferior ao limite de detecção do método ou, ainda, se a cadeia polipeptídica originada apresentasse comportamento similar a esta fração.

Os métodos eletroforéticos são considerados muito seguros para misturas de leite de vaca, cabra e ovelha, mas não tanto para queijos maturados. Isso porque, nos processos proteolíticos que têm lugar na maturação, as caseínas se degradam, a sensibilidade do método diminui e a interpretação dos resultados é muito mais difícil. O problema é menor em queijos não proteolisados, tendo sido adotado um método para detectar e dosar leite de vaca em leite de cabra e em queijos “Saint Maure” e “Chabichu”, obtendo-se resultados satisfatórios até 15 a 20 dias de maturação. A sensibilidade do método permite detectar um mínimo de caseína de vaca correspondente à adição de 1,5% a 2% de leite de vaca ao de cabra, antes da preparação do queijo. Este método é utilizado oficialmente na França para análises de queijo de cabra. A proporção de leite de vaca é avaliada a partir do valor de caseína α_s , mas, como este valor pode variar no leite, estudos demonstram que o método apresenta uma imprecisão de 26%

em leites individuais, porém, apenas 10% em leites de grandes misturas, como é o que se encontra na prática. Em outro experimento, conseguiu-se detectar 5% de leite de vaca em queijos frescos de cabra, preparados em laboratório sem adição de fermento. A detecção de leite de vaca em queijos industrializados se viu dificultada pela degradação das caseínas (Ramos & Juárez, 1985).

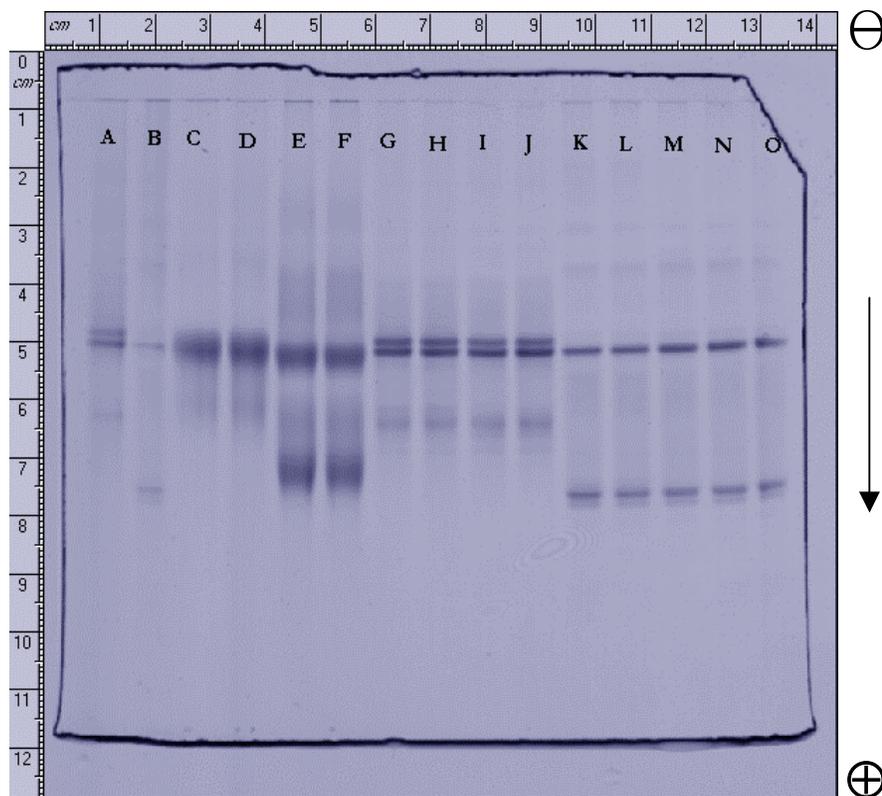
A limitação da aplicação destas técnicas a queijos maturados sugere que a presença de microrganismos psicotróficos em leite possa apresentar efeitos similares.

Leite et al. (1999), avaliando a contagem de psicotróficos no leite de cabra cru na região de Florestal, MG, encontraram um predomínio deste tipo de microrganismo na flora total do leite. Estes microrganismos são capazes de secretar proteases e lipases termoestáveis que, mesmo em baixas concentrações, podem hidrolisar as proteínas do leite, causando geleificação no leite UHT. Contagens de psicotróficos superiores a 5×10^6 ufc/mL são requeridas para que alterações sensoriais sejam detectadas no leite, devido à produção e ação de lipases e proteases. Os resultados demonstram que, em alguns meses do ano, as médias superaram a faixa de 10^5 ufc/mL. Segundo Ferreira et al. (1992), a presença de psicotróficos em leite de cabra deve ser monitorada levando-se em conta que as atividades proteolíticas e lipolítica destas bactérias podem ser até mais deletéria neste leite do que no de vaca, devido às diferenças composicionais.

4.4.3 Processamento térmico e desidratação

Foram avaliadas amostras de leite de cabra e de vaca cru, pasteurizado, em pó e UHT (Ultra High Temperature), com o objetivo detectar possíveis limitações da técnica estudada decorrentes da alteração dos perfis eletroforéticos pelo processamento.

As Figuras 25 e 26 apresentam o gel de corrida e os respectivos densitogramas obtidos, nos quais foi mantida a escala de uma régua lateral para melhor avaliação das distâncias percorridas pelas bandas, ou seja, das mobilidades das frações protéicas estudadas.



- A. Leite de cabra UHT
- B. Leite de vaca UHT
- C. Leite de cabra em pó
- D. Leite de cabra em pó
- E. Leite de vaca em pó
- F. Leite de vaca em pó
- G. Leite de cabra pasteurizado
- H. Leite de cabra pasteurizado
- I. Leite de cabra cru
- J. Leite de cabra cru
- K. Leite de vaca pasteurizado
- L. Leite de vaca pasteurizado
- M. Leite de vaca cru
- N. Leite de vaca cru
- O. Leite de vaca cru

FIGURA 25 Eletroforese em gel de poliacrilamida (8,5%) com uréia de amostras de leite de cabra e de vaca submetidas a diferentes tratamentos térmicos.

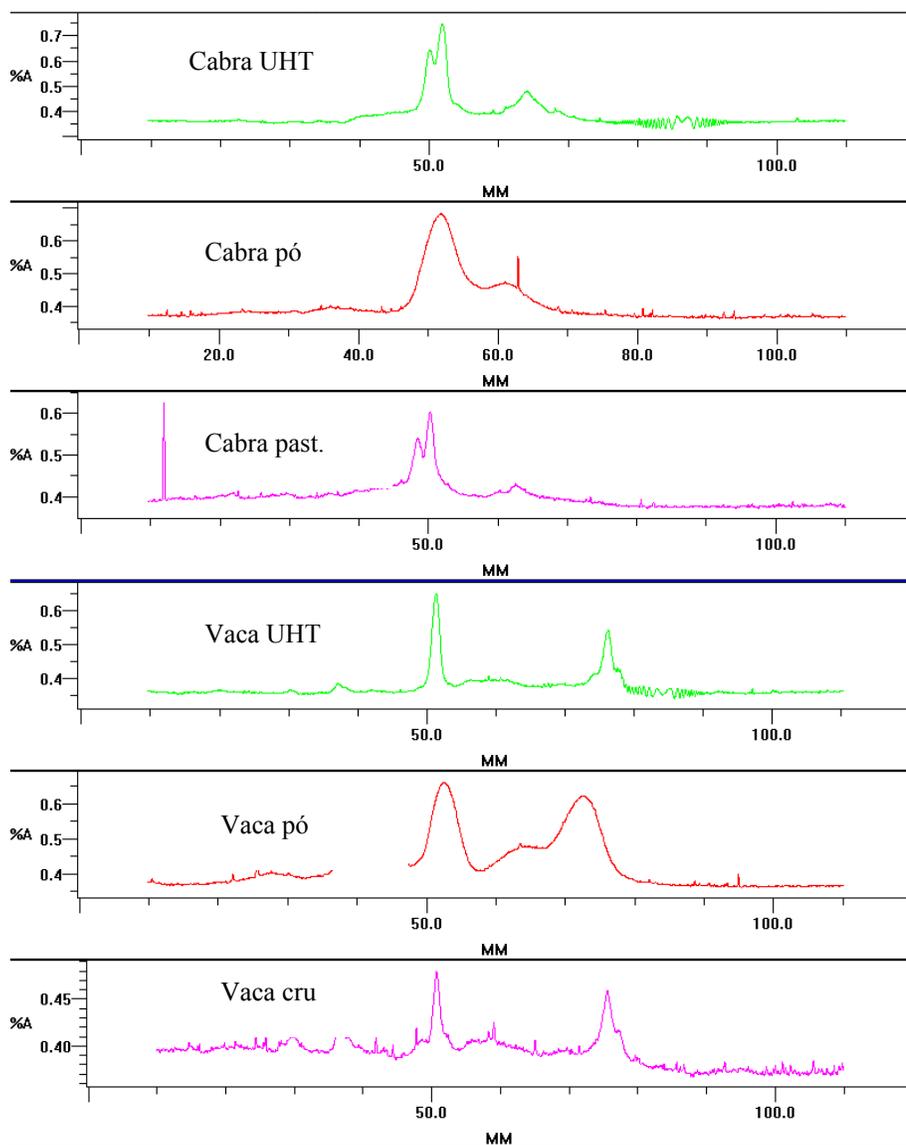


FIGURA 26 Densitogramas obtidos a partir do gel de corrida (8,5%) pela técnica UREA-PAGE, de amostras de leite de cabra e de vaca submetidas a diferentes tratamentos térmicos (UHT, pó, pasteurizado e cru).

A avaliação das amostras demonstra que os perfis eletroforéticos obtidos com leite cru e pasteurizado não diferiram, mas há variação no comportamento das amostras em pó e que sofreram processamento UHT, principalmente nestas primeiras. Entretanto, apresentaram similaridade nas posições das bandas eletroforéticas, o que se pode perceber, tanto pela observação do gel como dos densitogramas. Isto sugere que o método proposto para detecção de fraude de leite de cabra pela adição de leite de vaca, baseado na presença ou ausência da fração α_{s1} -CN bovina, pode ser válido também para amostras processadas, embora sejam necessários estudos mais aprofundados neste sentido. Provavelmente, modificações na técnica de preparação das amostras poderão ser úteis para melhorar a resolução de separação das bandas protéicas.

Furtado (1983) indica a adoção deste método para detecção de adulteração no leite pasteurizado.

Segundo Ramos & Juárez (1985), os métodos eletroforéticos são válidos também para estudar leites que tenham sofrido tratamentos térmicos intensos, uma vez que a fração estudada (as caseínas) não é afetada.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- a técnica de UREA-PAGE apresentou a melhor resolução, rapidez e praticidade entre os métodos testados para detecção de fraude de leite de cabra pela adição de leite de vaca;

- os leites de cabra e vaca apresentam perfis eletroforéticos diferenciados, especialmente com relação à α -caseína, cuja banda, no leite de vaca, exibe mobilidade eletroforética maior que sua homóloga no leite de cabra, apresentando também concentração mais expressiva, nas condições estudadas. A posição alcançada por esta fração caseínica na corrida eletroforética foi sempre diferenciada entre os leites das duas espécies;

- as amostras de leite de vaca não diferiram entre si quanto aos perfis eletroforéticos, em termos de rebanhos nem de tanques de expansão comunitários, quando analisadas pelo método selecionado;

- as amostras de leite de cabra apresentaram diferenças nos perfis eletroforéticos, consideradas amostras individuais, rebanhos e raças, mas não apresentaram a fração correspondente à de maior mobilidade da caseína bovina;

- a adição de leite de vaca ao leite de cabra fez variar o perfil eletroforético no sentido da presença e intensidade da banda de α -caseína bovina, demonstrando que, quanto maior a quantidade adicionada, maior a concentração observada desta fração protéica na amostra, avaliada em função de sua densidade eletroforética por meio da área do pico específico no densitograma. Adições mínimas de 4,76% de leite de vaca ao de cabra puderam ser identificadas pela avaliação visual dos densitogramas;

- as amostras de leite de cabra e vaca não apresentaram diferenças nos perfis eletroforéticos em função do uso de Bronopol® e conservação a frio, nas condições avaliadas;

•as amostras de leite de cabra e vaca apresentaram diferenças no perfil eletroforético em função do processamento UHT e pó, sob as condições em que o experimento foi desenvolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A CAPRINOCULTURA. Disponível em:

<<http://www.bodeonline.com.br/caprinocultura.asp>>. Acesso em: 30 dez. 2002.

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

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.

ALMEIDA, A. L. et al. Caracterização da qualidade do leite de cabra comercializado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.55, n.315, p.86-90, 2000. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 17., 2000, Juiz de Fora, MG).

ALMEIDA, A. L. et al. Avaliação do método de determinação da enzima xantino oxidase para identificação de adulteração de leite de cabra por adição de leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.55-62, 2001. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG).

ALVES, F. S. F. Leite de cabra e derivados: as barreiras sanitárias. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/utilid10.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Washington, 1992. 546 p.

ANDRADE, P. V. D. et al. Métodos para determinação do teor de proteína em leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.55, n.315, p.90-93, 2000. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 17., 2000, Juiz de Fora, MG).

ANDRADE, P. V. D. et al. Avaliação da qualidade do iogurte de leite de cabra produzido e comercializado na grande Belo Horizonte - MG. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 97-100, 1999. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG).

ANREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, Ayr, v.56, p. 45-55, 1983.

A QUEIJARIA Suíça de Nova Friburgo. **O Berro**, v.48, mar./abr. 2002.
Disponível em <http://www.zebus.com.br/noticia4_48_berro.htm>. Acesso em 23 mar.2003.

ASPECTOS nutricionais. Disponível em: <<http://www.capri-vita.com.br/aspectos2.html>>. Acesso em 23 mar. 2003.

AS PROTEÍNAS: pequena introdução ao mundo protéico! **Revista Aditivos & Ingredientes**. Editora Insumos, n.20, p. 42-58, 2002.

BANIA, J. et al. Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. **Journal of Dairy Research**, Ayr, v. 68, n. 2, p. 333-336, 2001.

BASCH, J. J. et al. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n.1, p. 23-31, 1985.

BLAKESLEY, R. W.; BOEZI, J. A. A new staining technique for protein in polyacrylamide gels using Comassie Brilliant Blue G250. **Anal. Biochem.**, v.82, p. 580-582, 1977.

BONASSI, I. A. Leite de cabra: característica e tecnologia. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.42, n. 251, p.17-21, 1987.

BONASSI, I. A. et al. Efeito da temperatura ambiental na composição protéica do leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.53, n.304, p.65-71, 1998. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15., 1998, Juiz de Fora, MG).

BONASSI, I. A. et al. Efeito da temperatura ambiental na formação de ácidos graxos livres em leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.54, n.312, p.14-18, 2000.

BONASSI, I. A.; KROLL, L. B.; VIEITES, R. L. Composição protéica do leite de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 218-222, 1996.

BONASSI, I. A.; MARTINS, D.; ROÇA, R. O. Composição química e propriedades físico-químicas do leite de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.1, p. 57-63, 1997.

BORGES, C. H. P.; BRESSLAU, S. **Produção de leite de cabra em confinamento**. Disponível em: <<http://www.capritec.com.br/art020624.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2003.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. **Embrapa Trigo**, n.6, 2001. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06_1.htm>. Acesso em: 01 jan. 2003.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 24 e 26 jan. 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. II – Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Conselho Nacional de Saúde, 06 de maio de 1999.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Leis. Decretos. **Instrução Normativa n.º 37**, da de 31/10/2000: Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm37_leitecabra.htm>. Acesso em: 21 fev. 2003c.

BRUNNER, J. R. Cow milk proteins: twenty-five years of progress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, n.6, p. 1038-1054, 1981.

CABRA marcada para render. **Revista Isto é**, 20 ago. 1997. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/istoe/politica/145521.htm>> Acesso em: 23 mar.2003.

CARNEIRO, M. Bahia: leite de cabra ganha versão longa vida. **Gazeta Mercantil**. Disponível em: <www.milkpoint.com.br>. Acesso em: 05 abr. 2002.

CASTRO, J. F. et al. Composição físico-química e contagem de células somáticas de leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.57, n.327, p.311-313, 2002. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 14., 2002, Juiz de Fora, MG).

CONTINENTE on line: Queijos. Os queijos portugueses. 1999. Disponível em: <http://www.conselhos.continente.pt/auto_frame.html?http%3A//www.conselhos.continente.pt/tema/alim/queijo/portugais.asp>. Acesso em: 23 mar. 2003.

CORDEIRO, P. R. C.; EMBRAPA, Laboratório Qualidade do Leite. **Médias das análises realizadas** – produtores fornecedores de leite de cabra para CCA Laticínios. Juiz de Fora, não publicado, 2p, 2001.

CORDEIRO, P. R. C. **Sincronização de cio em cabras leiteiras com fotoperiodismo artificial**. Disponível em: <<http://www.nib.unicamp.br/hvzb/ruminantes/rum001.htm>>. Acesso em: 23 mar.2003.

COSTA, A. L. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa. Disponível em: <www.vivernocampo.com.br/pecuaria/pecuedeleitecaprinos.htm>. Acesso em: 01 jan. 2003.

COSTA, A. L. **Leite caprino**: um novo enfoque de pesquisa. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/artigo15.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2002.

COVARRUBIAS, M. P.; ISRAEL, L. E.; VALDENEGRO, V. Desnaturação de proteínas do soro de leite por processos térmicos – UHT. Densitometria em géis de poliacrilamida. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.43, n.258, p. 15-20, 1998.

CURI, D. **Noções básicas de eletroforese**. 2001. Disponível em: <http://jbcs.sbq.org.br/jbcs/2001/vol12_n4/507-00.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2003.

CURI, R. A.; BONASSI, I. A.; CURI, P. R. Avaliação sensorial de um produto análogo ao queijo pecorino romano utilizando-se leite de cabra congelado e coalhada congelada. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.57, n.327, p. 240-242, 2002. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 14., 2002, Juiz de Fora, MG).

DIAS, A. M. A. et al. Avaliação físico-química de três marcas comerciais do leite de cabra comercializado na região metropolitana do Recife. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.57, n.324, p.47-50, 2002.

DINIZ, A. C. P. **Avaliação nutricional do leite de cabra a partir do efeito da β -ciclodextrina na melhora de suas características sensoriais.** Disponível em: <<http://www.cal.ufsc.br/qbial.html>>. Acesso em: 04 mar. 2001.

EIGEL, W. N. et al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.67, n.8, p. 1599-1631, 1984.

EXPERIMENT IV: quantitation & electrophoresis of proteins. Disponível em: <<http://www.cas.vanderbilt.edu/bsci111a/index.htm>>. Acesso em: 01 jan. 2003.

FERREIRA, C. L. L. F.; THAMA, S. F. M. S.; NEUMANN, E. Qualidade microbiológica do leite de cabra armazenado a 4 °C, tratado termicamente e mantido sob refrigeração por sete dias. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.47, n.279/281, p.37-40, 1992. (SEMANA DO LATICINISTA, 32., 1992, Juiz de Fora, MG).

FERREIRA, R. M. A influência da alimentação no ser humano – I, II e III. **Alimento e Saúde**. 2000. Disponível em: <http://www.geocities.com/volteaodden/alimento_saude/influencia_da_alimentacion.html>. Acesso em: 25 jan. 2003.

FISBERG, M. et al. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. **Separata da Revista Pediatria Moderna**, São Paulo, v.35, n.7, não paginado, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 e 23 jan. 2003.

FOX, P. F.; MULVIHILL, D. M. Milk proteins: molecular, colloidal and functional properties. **Journal of Dairy Research**, Ayr, v. 49, p. 679-693, 1982.

FURTADO, M. A. M. **Caracterização de hidrolisados de proteína láctea coprecipitada**. 1999. 116 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

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

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

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Leite de cabra: composição e industrialização. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.33, n.198, p.15-17, 1978.

GOMES, M. I. F. V. et al. Características químicas, microbiológicas e sensoriais de leite de cabra congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n. 2, p. 111-114, 1997.

GUARDA, A.; CARNEIRO, M. Programas estimulam produção de leite no Nordeste. **Gazeta Mercantil**, 25 mar. 2002. Disponível em: <www.milkpoint.com.br>. Acesso em: 05 abr. 2002.

GUIMARÃES, M. P. S. L. M. P. **Avaliação a estabilidade físico-química do leite caprino congelado durante a estocagem comercial**. 1993. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2ed. Oxford: IRL, 1990. 383 p.

HASHIMOTO, E. M.; ANTUNES, L. A. F. Efeito do tratamento térmico na desnaturação de beta-lactoglobulina caprina. **Arq. Biol. Tecnol.**, Londrina, v. 35, n.3, p. 543-556, 1992.

HEALTH links: nutrition and vitamins. Disponível em: <http://198.173.238.162/nutrition_vitamins/vitamin_b.htm>. Acesso em: 28 mar. 2003.

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

IGARASHI, Y. An improved procedure for the preliminary fractionation of milk proteins. **International Dairy Journal**, Ireland, v.5, p.305-310, 1995.

INDUSTRIALIZAÇÃO do leite de cabra. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/revista/mattec/0145.asp>>. Acesso em: 23 mar. 2003.

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

JAUBERT, A.; DURIER, C.; KOBILINSKY, A.; MARTIN, P. Structural organization of the goat casein micelle: effect of the physico-chemical environment (pH, temperature, ionic strength) on its mineral and protein composition. **International Dairy Journal**, Elsevier, v.9, p. 369-370, 1999.

JAUBERT, A.; MARTIN, P. Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. **Lait**, Elsevier, v.72, p. 235-247, 1992.

JENNESS, R. Comparative aspects of milk proteins. **Journal of Dairy Research**, Ayr, v.46, n.2, p.197-210, 1979.

JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: review 1969 – 1979. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.10, p.1605-1630, 1980.

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

LAGUNA, L. E.; ARAÚJO, A. M.; EGITO, A. S. Avaliação físico-química do leite de cabra das raças Saanen e Anglo-nubiana. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.57-61, 1999. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., 1999, Juiz de Fora, MG).

LAGUNA, L. E.; EGITO, A. S. Atividade coagulante de extratos vegetais no leite integral de caprino e bovino. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.179-185, 2001. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG).

LAGUNA, L. E.; EGITO, A. S.; NUNES, R. G. F. Avaliação físico-química do leite de cabra em três rebanhos mestiços na região de Sobral, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.53, n.304, p. 153-157, 1998. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15., 1998, Juiz de Fora, MG).

LAGUNA, L. E.; EGITO, A. S.; RODRIGUES, R. C. Atividade coagulante de extratos vegetais no leite de cabra submetido a diferentes temperaturas. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.55, n.315, p.52-58, 2000. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 17., 2000, Juiz de Fora, MG).

LAMPO, S. M.; CAROPPO, S. Un metodo per la messa in evidenza del latte di vacca aggiunto a quello di capra. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Lodi, v.31, n.2, p.139-143, 1980.

LARSON, B. L. Biosynthesis and secretion of milk proteins: a review. **Journal of Dairy Research**, Ayr, v.46, n.2, p.161-174, 1979.

LEITE, M. O. et al. Avaliação microbiológica de leite de cabra produzido em Florestal, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.94-96, 1999. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 1999, Juiz de Fora, MG).

LOEWENSTEIN, M. et al. Research on goat milk products: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.10, p.1631-1648, 1980.

MAYER, H. K.; HEIDLER, D.; ROCKENBAUER, C. Determination of the percentages of cow's, ewe's and goat's milk in cheese by isoelectric focusing and cation-exchange HPLC of γ - and para- κ -caseins. **International Dairy Journal**, Elsevier, v.7, p.619-628, 1997.

McMAHON, D. J.; BROWN, R. J. Composition, structure, and integrity of casein micelles: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.67, n.3, p.499-512, 1984.

MEDEIROS, R. S. et al. Determinação dos componentes físico-químicos de ricota produzida com leite de cabra no brejo paraibano. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.56, n.318, p.42-45, 2001.

MERRIL, C. R. Gel-staining techniques. In: DEUTSCHER, M. P. **Guide to protein purification**. Academic Press, San Diego, CA, 1990. p. 477-487.

MOLECULAR Biology Cyberlab. Experiment 2: Gel electrophoresis of DNA. Disponível em: <<http://www.life.uiuc.edu/molbio/index.html>>. Acesso em: 01 jan. 2003.

MOLINA, E.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; RAMOS, M. Analysis of cow's, ewe's and goat's milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. **International Dairy Journal**, Elsevier, v.9, p.99-105, 1999.

NEVES, L. S. et al. Viabilidade de concentrado de células de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) em leite de cabra estocado sob refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.55, n.315, p.176-180, 2000. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 17, 2000, Juiz de Fora, MG).

NOVA LEGISLAÇÃO comentada de produtos lácteos. São Paulo: Revista Indústria de Laticínios (ed.), 2002. 327 p.

O LEITE de cabra. O queijo. Disponível em:
<<http://www.ccalaticinios.com.br/>>. Acesso em: 23 mar. 2003.

OPÇÃO de mercado do leite de cabra e derivados. out. 1998. Disponível em:
<http://www.fazendageneve.com.br/pagina_queijaria.htm>. Acesso em: 23 mar. 2003.

PARK, Y. W. **Hipo-allergenic and therapeutic significance of goat milk**. 1993. Disponível em: < <http://caprilat.lighthouse.com.br/editor/rte/pop-up.php?link=http://caprilat.lighthouse.com.br/pdf/Hipo.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2003.

PENNA, C. F. A. M. et al. Avaliação físico-química de leite de cabra produzido em Florestal - MG. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.230-234, 1999. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., 1999, Juiz de Fora, MG).

PEREIRA FILHO, J. Leite de cabra garante renda de pecuarista no Nordeste. **Giro Lácteo**. 15 jun. 2001. Disponível em: <www.milkpoint.com.br>. Acesso em: 05 mar. 2002.

PEREIRA, D. B. C. et al. **Físico-química do leite e derivados** – métodos analíticos. 2.ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001. 234 p.

PINTO, S. M. et al. Modificação no perfil dos ácidos graxos da gordura do leite através da alimentação de vacas leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.312, p.40-46, 2000.

PORTUGAL in site: Roteiro gastronômico de Portugal. Queijos. 2001. Disponível em: <<http://www.gastronomias.com/queijos/>>. Acesso em: 23 mar. 2003.

PORTUGAL, J. A. B. **Projeto “Leite na Merenda Escolar”**. Juiz de Fora: PREFEITURA MUNICIPAL DE JUIZ DE FORA. Gerência de Pecuária, Agricultura e Abastecimento. Conselho Municipal de Agropecuária e Abastecimento. Câmara de Leite. 2002. 17 p.

PRATA, L. F. et al. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). Região Sudeste, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, p. 428-432, 1998.

PREFEITURA MUNICIPAL DE JUIZ DE FORA. Programa Municipal de Defesa do Consumidor. Regulamenta os direitos do consumidor. **Código de Defesa do Consumidor**. Lei n.º 8078, de 11/set/1990. Título I, Capítulo IV, Seção I, Artigos 8, 9 e 10.

PRODUÇÃO de queijos de leite de cabra. Disponível em:
<<http://www.cpt.com.br/videocursos.asp?s=19&p=144>>. Acesso em: 23 mar.
2003.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. **Eletroforese capilar**. 2001.
Disponível em: <<http://www.chemkeys/bra/index.htm>>. Acesso em: 01 jan.
2003.

RAMOS, M.; JUÁREZ, M. Estado actual de los metodos analiticos existentes
para detectar mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. **Revista Española de
Lecheria**, Madrid, n.4, p.5-12, 1985.

RAMOS, M.; JUÁREZ, M. The composition of ewe's and goat's milk.
International Dairy Federation: Commission A, doc 50, Bristol, 1980. 19 p.

RICHARDS, N. S. P. S. et al. Avaliação físico-química da qualidade do leite de
cabra pasteurizado comercializado na grande Porto Alegre, RS. **Revista do
Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.212-
216, 2001a. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2001, Juiz de Fora,
MG).

RICHARDS, N. S. P. S. et al. Análise dos indicadores de qualidade
microbiológica do leite de cabra pasteurizado comercializado na grande Porto
Alegre, RS. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de
Fora, v. 56, n. 321, p. 217-220, 2001b. (CONGRESSO NACIONAL DE
LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG).

ROTEIRO dos queijos de cabra. Disponível em:

<<http://www.turismoextremadura.com/portugues/gastronomica/ruta9.htm>>.

Acesso em: 23 jan. 2003.

RUEDA, A. P. et al. Consumo de ácido cítrico e produção de diacetil por culturas lácticas produtoras de aroma em leites desnatados de vaca e cabra.

Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, v.47, n. 279/281, p.46-49, 1992.(SEMANA DO LATICINISTA, 32., 1992, Juiz de Fora, MG).

SAMAYA, W. N. et al. Chemical composition and nutritive value of goat milk.

Journal of Dairy Science, Champaign, v.67, n.8, p.1655-1659, 1984.

SAMPLE soluções: Eletroforese em gel de agarose. Disponível em:

<<http://www.biomania.com.br/biotecnologia/eletroforese.php>>. Acesso em: 01 jan. 2003.

SAÚDE e nutrição. 2000. Disponível em:

<<http://www.saudegratuita.com.br/saudenutricao/classifalimentos.asp>>. Acesso em: 25 jan. 2003.

SEABRA, J. História do queijo. Disponível em:

<<http://sapp.telepac.pt/padariaclassica/Index.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2003.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento.

São Paulo: Almed, 1987. 387 p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SILVA, A. M. C.; ALBUQUERQUE, S. S. M. C.; BISCONTINI, T. M. B. Efeito de processos de pasteurização aplicados em leite de cabra no estado de Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.57, n.327, p.128-132, 2002. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora, MG).

SILVA, A. M. C.; BISCONTINI, T. M. B.; ALBUQUERQUE, S. S. M. C. Avaliação microbiológica de leites de cabra comercializados em Recife - PE. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.56, n. 321, p.126-130, 2001. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG).

SILVA, M. R. et al. Desempenho da cultura de iogurte em meios contendo leite de cabra, leite de vaca e extrato solúvel de soja PS-60. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.48, n.285, p.10-18, 1993a.

SILVA, M. R. et al. Determinações comparativas das características físico-químicas do leite de cabra e do leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.48, n.285, p.3-9, 1993b.

SILVA, P. H. F.; VENUTO, P. R. M. Intolerância à lactose. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.50, n.296, p.27-32, 1995.

SILVA, W. P.; FAGUNDES, C. M. Avaliação da fermentação láctica do leite de cabra *Capra hircus*, L.acrescido do antibiótico kanamicina. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.46, n.276/278, p.22-25, 1991.

SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas**: guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125p.

SOUZA, E. M. T. et al. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.3, 9p., 2000.

STRANGE, E. D. et al. Chromatographic and eletrophoretic methods used for analysis of milk proteins. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, n. 624, p. 81-102, 1992.

SZIJARTO, L.; VAN DE VOORT, F. R. Determination of added water and bovine milk to caprine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.66, n.3, p.620-623, 1983.

TANEZINI, C. A. et al. **Qualidade do leite caprino cru da bacia leiteira de Goiânia**. Goiânia: UFG. 2000. 82 p.

THOMASI, A. Projeto incentiva leite de cabra no Ceará. **Gazeta Mercantil** 03 jan. 2002. Disponível em: <www.milkpoint.com.br>. Acesso em: 05 abr.2002.

TRAVASSOS, A. E. R.; MEDEIROS, R. S.; MANGUEIRA, T. F. B. Análise de microrganismos indicadores, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* em ricota de leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de

Fora, v.56, n.321, p.116-121, 2001. (CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora, MG).

ULHOA, M. F. P. Criada a associação dos criadores de caprinos e ovinos da região de Uberaba – ACCORU. Disponível em:

<<http://www.fazu.br/cursos/graduacao/zootecnia/noticia04.php>>. Acesso em: 23 mar.2003.

VIDIGAL, M. C. **Separação de proteínas através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida**. Juiz de Fora: EMBRAPA/NUTRE, 2001.

VITAMINA A ou retinol. Disponível em:

<http://www.dammous.com/nutri/nutrie/vitam_a.asp>. Acesso em: 28 mar. 2003.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987. 423 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:

<<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 25 jan. 2003.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Parâmetros físico-químicos médios obtidos por diversos autores.	122

TABELA 1 A Parâmetros físico-químicos médios obtidos por diversos autores

Trabalho Autor/ano	Parâmetros físico-químicos de qualidade										
	D ₁₅ (g/mL)	Umid. (%)	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	PTN (%)	pH	Lact. (%)	Cinz. (%)	Acidez (%)	DPC (°mH)
Parkash, 1968#	--	--	3,0 a 5,5	11,30 a 15,0	--	2,9 a 4,6	--	3,8 a 5,1	0,69 a 0,89	--	--
Le Jaouen, 1972°	--	--	3,36	11,50	--	2,90	--	--	--	--	--
Dozet, 1973°	--	--	3,07	11,95	9,12	3,51	--	--	0,88	--	--
Jaquen, 1974+	1,03000	91,40	--	11,60	8,20	3,00	--	4,50	0,70	--	--
Furtado, 1978*	1,03500	85,42	4,60	14,58	10,11	3,70	6,65	--	--	--	--
Furtado, 1978	1,03100	85,88	4,69	14,12	9,43	3,95	6,57	4,72	0,77	0,1770	-558
Jenness, 1980	--	--	3,07 a 7,76	11,5 a 21,55	--	2,90 a 5,06	--	4,01 a 6,3	0,71 a 0,88	--	--
Andrade, 1982*	1,03250	85,20	4,79	14,80	9,77	4,43	--	--	--	--	--
Araújo, 1986*	1,03600	86,71	4,05	13,29	9,24	4,16	6,59	--	--	--	--
Júnior, 1992*	1,03190	88,36	3,02	11,64	8,67	--	6,60	--	--	--	--
Rueda, 1992	--	--	0,47	9,79	--	3,84	--	4,68	0,77	--	--
Ferreira, 1992	1,03900	--	4,76	13,73	8,96	4,21	6,57	--	--	0,1866	--
Silva, 1993	1,03100	--	3,67 e 4,38	12,41 e 13,72	--	3,57 e 3,96	6,51 e 6,61	4,40 e 4,60	0,78	0,1800	--
Guimarães, 1993	--	--	4,60 e 0,37 ¹	--	--	--	6,73	--	--	0,138 a 0,19 ²	--
Tronco, 1996*	--	87,00	4,00	13,00	9,00	3,70	--	--	--	--	--
Bonassi, 1997	1,03105	87,22	3,47	12,18	8,71	4,11	6,65	4,33	0,77	0,1600	-580
Egito, 1997*	1,03200	85,57	5,11	14,43	9,29	3,48	6,72	--	--	--	--
Pereira, 1997*	1,03153	87,51	3,66	12,49	8,82	3,50	6,70	--	--	--	--

....continua.....

TABELA 1 A, Cont.

Trabalho Autor/ano	Parâmetros físico-químicos de qualidade										
	D ₁₅ (g/mL)	Umid. (%)	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	PTN (%)	pH	Lact. (%)	Cinz. (%)	Acidez (%)	DPC (°mH)
Gomes, 1997	1,03000	--	2,70	11,03	--	--	6,62	--	--	0,1460	--
Laguna, 1998*	1,03070	86,96	4,24	13,06	8,80	3,0 6	6,80	--	--	--	--
Prata, 1998	1,03240	88,49	3,74	11,51	7,77	2,97	6,65	4,35	0,74	0,1611	-574
Behmer, 1999*	1,03850	88,17	6,86	11,83	--	--	--	--	--	--	--
Laguna, 1999	1,03000 a 1,03200	85,10 a 88,83	2,65 a 5,55	11,10 a 14,89	8,44 a 9,32	2,66 a 3,25	6,81 a 6,91	3,63 a 3,78	0,782 a 0,88	0,1385 a 0,1704	-536,5 a -546,5
Penna, 1999	1,02900	--	3,60	11,80	8,20	2,70	--	--	--	0,1410	-564
Merin, 2000*	--	87,52	3,95	12,48	8,53	3,33	--	--	--	--	--
Almeida, 2000*	1,02827	88,39	3,58	11,61	8,03	--	--	--	--	--	--
Tanezini, 2000	1,0300	--	3,09 a 3,13	12,24	--	3,41	6,56 a 6,58	4,75 a 4,78	0,80 a 0,84	0,1500 a 0,1600	-565
Almeida, 2000	1,02393 a 1,03163	--	2,54 a 4,28	9,28 a 13,29	6,74 a 9,01	--	--	--	--	0,1490 a 0,1738	-502 a -562
Richards, 2001a	1,02600 a 1,02800	--	3,96 a 4,38	12,08 a 12,23	7,85 a 8,19	--	6,59 a 6,77	--	--	0,1482 a 0,1998	--
Cordeiro, 2001	--	--	3,07 a 4,58	10,93 a 13,23	--	2,69 a 3,21	--	4,10 a 4,77	--	--	--
Dias, 2002	1,03100 a 1,03800	87,9361 a 89,07	3,90 a 4,20	10,9299 a 12,0639	6,8299 a 7,8639	2,500 a 2,9336	6,3220 a 6,5025	--	--	--	--
Silva, 2002	1,03070 a 1,03390	--	3,0 a 3,9	10,21 a 12,03	7,07 a 8,18	2,67 a 3,02	--	3,95 a 4,43	0,70 a 0,77	0,1267 a 0,1426	-560 a -630
Castro, 2002	--	--	3,20	--	--	2,73	--	--	--	--	--

Fonte: Bonassi, 1987; Furtado & Wolfschoon-Pombo, 1978; Jenness, 1980; Rueda et al., 1992; Ferreira et al., 1992; Silva et al., 1993b; Guimarães, 1993; Bonassi et al., 1997; Gomes et al., 1997; Prata et al., 1998; Laguna et al., 1999;

Penna et al., 1999; Tanezini et al., 2000; Almeida et al. 2000; Richards et al., 2001a; Cordeiro, 2001; Dias et al., 2002; Silva et al., 2002; Castro et al., 2002.

- citado por Guimarães, 1993

° - citados por Prata et al., 1998

+ - citado por Bonassi, 1987

* - citados por Dias et al., 2002

¹ - leite desnatado

² - esta amplitude de variação abrange os dados obtidos em todo o experimento, ou seja, em leite cru e pasteurizado, conservado congelado por até 90 dias.