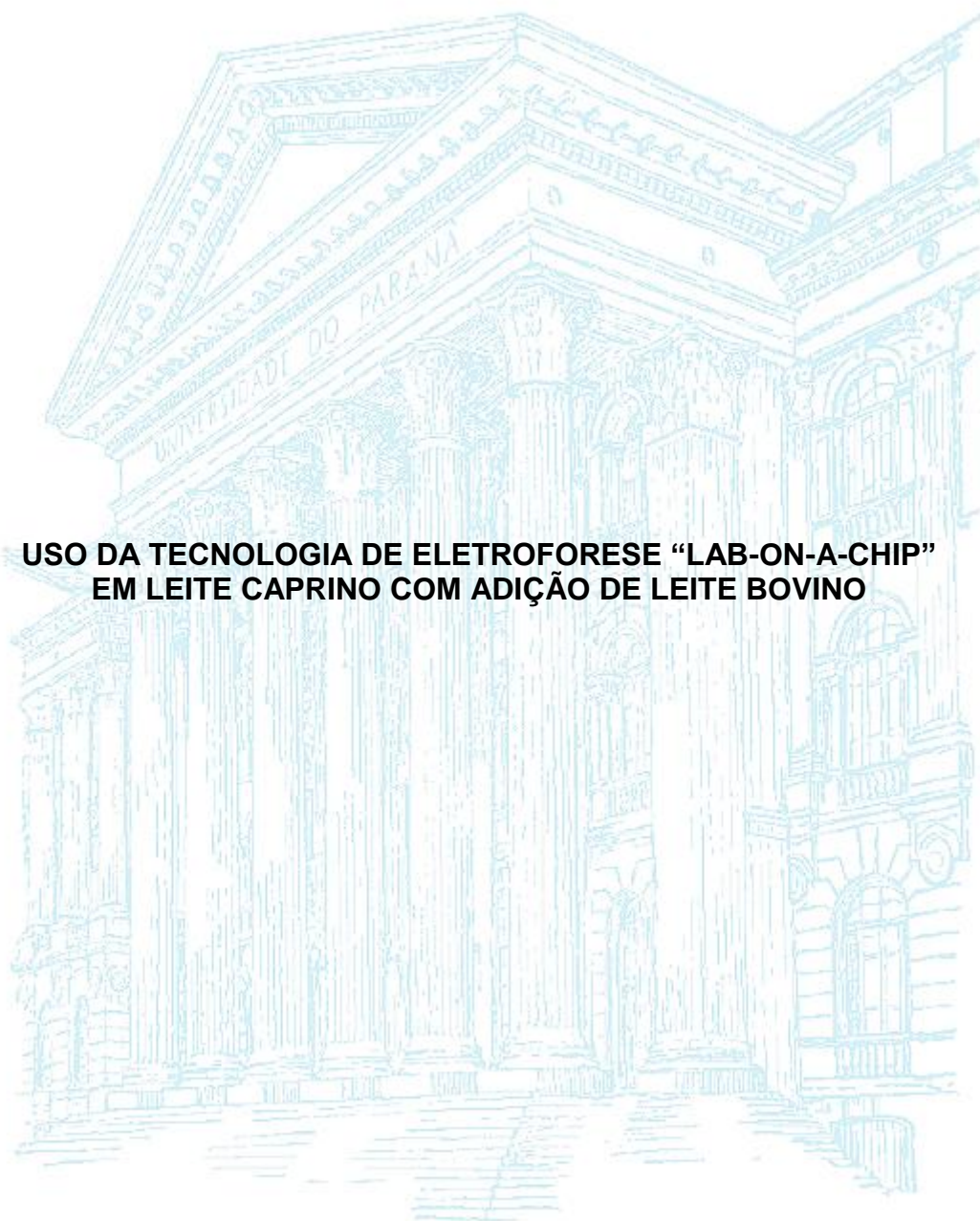


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE ZOOTECNIA**

DEBORA CRISTINA JESUS

**USO DA TECNOLOGIA DE ELETROFORESE “LAB-ON-A-CHIP”
EM LEITE CAPRINO COM ADIÇÃO DE LEITE BOVINO**



**CURITIBA
2013**

DEBORA CRISTINA JESUS

**USO DA TECNOLOGIA DE ELETROFORESE “LAB-ON-A-CHIP”
EM LEITE CAPRINO COM ADIÇÃO DE LEITE BOVINO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Juliana Bello Baron Maurer

Orientador do Estágio Supervisionado:
Pesquisadora Dr^a Marta Fonseca Martins

**CURITIBA
2013**

DEBORA CRISTINA JESUS

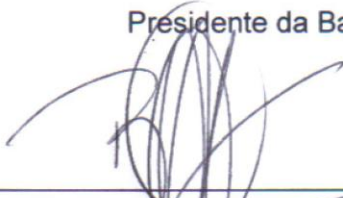
**USO DA TECNOLOGIA DE ELETROFORESE “LAB-ON-A-CHIP” EM LEITE
CAPRINO COM ADIÇÃO DE LEITE BOVINO**

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Zootecnia pela Universidade Federal do Paraná.

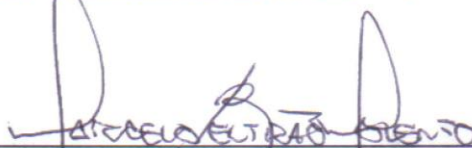
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Juliana Bello Baron Maurer
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR
Presidente da Banca



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida
Departamento de Zootecnia – UFPR



Prof. Marcelo Beltrão Molento, Phd
Departamento de Medicina Veterinária - UFPR

CURITIBA
2013

*Dedico este trabalho com muito amor à
minha mãe Maria Creotilde, que dedicou
sua vida por suas filhas.*

Ao Pedro e Vítor, os grandes amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me dar saúde e disposição para que eu pudesse aproveitar as oportunidades recebidas.

À minha mãe **Maria Creotilde** pela educação, exemplo de perseverança e por todo amor.

Às minhas irmãs **Devânia** e **Dayane** pela amizade, carinho e apoio.

Ao meu esposo e amigo **Pedro** por todo amor, compreensão, paciência, apoio e ajuda durante todo período acadêmico.

Ao meu filho **Vítor** que me despertou o maior amor que já pude sentir.

Às minhas amigas e amigos da UFPR, **Fernanda Freda**, **Faeli L. Nunes**, **Diogo N. Melo**, **Carlos Alexandre Demeterco (Nego)**, **Fabíola Cassanelli**, **Alex Lobo**, **Barbara Ratier**, **Déborah Pondelek** e todos que passaram na minha vida e deixaram um pouco de si e que de alguma forma contribuíram com meu crescimento profissional e pessoal.

À minha vó **Jardelina** (*in memoriam*), grande exemplo de bondade e que sempre lutou pelo melhor da família.

À **CEUC**, esse “lar em terra estranha”, onde vivi muitas boas histórias que espero poder lembrar sempre com as amigas ceuquianas, **Giseli Gontarski**, **Marcela (Py)**, **Sara Beckert**, **Fernanda Adamowski** e **Rosimeire Silva**.

Aos Professores do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, àqueles chamados mestres não apenas porque transmitem o conteúdo programático e sim por ser exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e de amor. Obrigada por contribuírem com meu crescimento profissional e pessoal.

À professora **Juliana Bello Baron Maurer**, pelo incentivo, carinho, amizade e pelas orientações para que este trabalho fosse realizado.

À Equipe da Embrapa Gado de leite, **Alessa Siqueira** e **Marta Fonseca Martins**, pela oportunidade de estágio, orientação profissional, confiança e amizade. À **Daniele**, **Michele**, **Laís** e **Isabella** pelas ajudas e amizade.

Desistir?

Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca
me levei realmente a sério.

É que tem mais chão nos meus olhos do
que o cansaço nas minhas pernas, mais
esperança nos meus passos, do que
tristeza nos meus ombros, mais estrada
no meu coração do que medo na minha
cabeça.

Cora Coralina

RESUMO

O leite caprino tem sido bastante valorizado devido suas características de alto valor nutritivo. Além disso, este leite apresenta algumas propriedades químicas que favorecem melhor digestibilidade e menor alergenicidade comparado ao leite bovino. As variações sazonais na disponibilidade do leite de cabra, a baixa produtividade da caprinocultura leiteira do Brasil, o menor rendimento na fabricação de queijo e o preço mais elevado, comparativamente ao leite de vaca podem motivar fraudadores a adicionar leite bovino no leite caprino. Por ser um produto que inclui uso terapêutico, fraudes desse tipo se tornam um problema de saúde e interesse público. Existem vários métodos utilizados na investigação de adição fraudulenta de leite de vaca em leite de cabra, porém são técnicas que demandam muito tempo para o processamento e análise dos dados das amostras. Visando analisar uma metodologia que demande pouco volume de reagentes tóxicos e que disponibilize resultados rápidos e precisos, o presente trabalho teve como objetivo realizar testes preliminares do método de eletroforese microfluídica em *chip* “Lab-on-a-chip” na detecção de adulteração de leite caprino com adição de leite bovino. As amostras são compostas por leite caprino da raça Saanen e leite bovino da raça Holandesa, provenientes de capris do município de Coronel Pacheco (MG) e tanques de leite do Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite de Coronel Pacheco (MG), respectivamente. Prepararam-se misturas de leite caprino com adições de leite bovino em proporções crescentes de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 50% (v/v), incluindo amostras de leite caprino e leite bovino puro. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e espectrofotômetro. Com as misturas de leite caprino e bovino em diferentes proporções foram preparados três grupos de amostras para testar a sensibilidade do método “Lab-on-a-chip”. As amostras de dois grupos foram diluídas em tampão SEP, um na proporção 1:5 e o outro na proporção 1:25. Com o terceiro grupo foi realizado a extração das caseínas das amostras, com o intuito de concentrá-las. Posteriormente todas as amostras foram submetidas a eletroforese pelo método Lab-on-a-chip e os perfis eletroforéticos das caseínas β , αS_1 e κ foram analisadas pelo sistema 2100 Expert Software. O método mostrou maior evidência das caseínas αS_1 e κ do leite bovino adicionado no leite caprino, nas amostras em que as caseínas foram extraídas. No entanto o perfil eletroforético das amostras diluídas em tampão SEP apresentou maior integridade dos picos formados pelo sistema de análise. Em todos os três grupos de amostras analisadas a caseína αS_1 bovina foi identificada em leite caprino com adições de leite bovino a partir de 20% (v/v). Considerando a necessidade de um método eficiente na fiscalização desse tipo de falsificação e a possível utilização do produto de fraude em volumes menores que o identificado pela técnica, conclui-se que o aperfeiçoamento dessa tecnologia pode aumentar sua sensibilidade, podendo consequentemente beneficiar os laticínios e os consumidores de produtos lácteos.

Palavras-chaves: adulteração em leite; caseínas αS_1 e κ ; proteínas do leite; detecção de fraude.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Série histórica de produção e rebanho caprino leiteiro no Brasil 1996-2011.	17
Figura 2.	Série histórica de produção e rebanho bovino leiteiro no Brasil 1996-2011.	18
Figura 3.	Estrutura das micelas de caseína do leite.	24
Figura 4.	Gel de agarose mostrando <i>amplicons</i> de DNA na detecção de leite bovino e caprino simultaneamente.	32
Figura 5.	Representação de eletroforese para separação de moléculas.	33
Figura 6.	Aplicação de amostras de proteínas em gel de poliacrilamida.	34
Figura 7.	Comparação das caseínas de leite de diferentes espécies, através da eletroforese para a detecção de fraude de leite de cabra com adição do leite de vaca obtido pelos métodos UREA-PAGE (A) e SDS-PAGE (B).	35
Figura 8.	Detecção de fraude de leite de cabra com adição do leite de vaca empregando o método NATIVE-PAGE.	36
Figura 9.	Separação de proteínas do leite pelo método de eletroforese microfluídica com a tecnologia “Lab-on-a-chip”	38
Figura 10.	Representação dos poços e canais de um <i>chip</i> da tecnologia “Lab-on-a-chip” para análise de proteína.	46
Figura 11.	Fluxograma do preparo das soluções do kit Agilent Protein 80, das amostras e as análises dos dados.	47
Figura 12.	Curva de calibração da proteína padrão BSA obtida pelo método de Bradford. FONTE: O autor, 2013.	48
Figura 13.	Perfil da corrida eletroforética de amostras de leite cru de cabra e leite cru de vaca, comparando as diferenças entre as amostras diluídas na proporção 1:5 (A) versus 1:25 (B).	51
Figura 14.	Perfil da corrida eletroforética de amostras de leite de cabra com adição de leite de vaca em proporções crescentes, comparando as diferenças entre as amostras com as caseínas purificadas (A) versus as amostras diluídas na proporção 1:5 (B) e 1:25 (C).	53
Figura 15.	Perfil da corrida eletroforética da amostra com 20% de adição de leite bovino no leite caprino, comparada à amostra de leite bovino puro.	54
Figura 16.	Perfil eletroforético das caseínas αS_1 , β e κ do leite de cabra e de vaca pela tecnologia “Lab-on-a-chip”	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Comparação de algumas técnicas utilizadas na detecção de fraude de leite caprino com adição de leite bovino.....	40
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Ranking dos principais países produtores de leite caprino no mundo..	16
TABELA 2. Ranking dos principais países produtores de leite bovino no Mundo...	18
TABELA 3. Composição química do leite de cabra e de vaca.	21
TABELA 4. Composição das proteínas de leite de cabra e leite de vaca.	22
TABELA 5. Comparação do peso molecular das proteínas do leite entre as técnicas SDS-PAGE e “Lab-on-a-chip”.	39
TABELA 6. Quantificação das proteínas totais das amostras leite de cabra adulterado com leite de vaca por espectrofotometria pelo método de Bradford.	49
TABELA 7. Comparação das massas moleculares das caseínas em análise referente ao leite caprino e bovino, estimadas pelo método “Lab-on-a-chip”.	50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	DADOS DE PRODUÇÃO	16
3.1.1	Leite Caprino	16
3.1.2	Leite Bovino	17
3.1.3	Dificuldades da Caprinocultura Leiteira no Brasil	19
3.2	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE CAPRINO VERSUS LEITE BOVINO	20
3.3	IMPORTÂNCIA DO LEITE DE CABRA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	25
3.4	INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO LEITE CAPRINO NA FABRICAÇÃO DE QUEIJO	26
3.5	ADULTERAÇÃO E FRAUDE EM LEITE	27
3.6	TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE COM MISTURAS ENTRE LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES	28
3.6.1	Método espectrofotométrico	28
3.6.2	Método Cromatográfico	29
3.6.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
3.6.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS-PAGE, UREA-PAGE E NATIVE-PAGE	32
3.6.5	Método de eletroforese de Focagem Isoelétrica	36
3.6.6	Método de eletroforese microfluídica “Lab-on-a-chip” (Agilent 2100 Bioanalyzer)	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO E LEITE BOVINO	41
4.2	PREPARAÇÃO DAS PROPORÇÕES DE MISTURA DE LEITE DE CABRA E VACA	41
4.3	QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS DE LEITE PELO MÉTODO DE BRADFORD	42
4.4	PREPARO DO TAMPÃO DE SEPARAÇÃO DE PROTEÍNA (SEP)	42
4.5	EXTRAÇÃO DAS CASEÍNAS	43
4.6	MÉTODO “LAB-ON-A-CHIP”	43
4.6.1	Preparo do Gel-Dye Mix (G)	44
4.6.2	Preparo da solução descolorante	45
4.6.3	Preparo da solução de desnaturação	45
4.6.4	Preparo das amostras e marcador de peso molecular	45
4.6.5	Preparo do microchip com os reagentes e as amostras	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	48
5.2	ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO “LAB-ON-A-CHIP”	49
6.	CONCLUSÃO	57
7.	RELATÓRIO DE ESTÁGIO	57
7.1	RELATÓRIO DE VISITA AO LABORATÓRIO DE QUALIDADE DO LEITE (LQL) DA EMBRAPA GADO DE LEITE	59
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS	61

ANEXOS	65
ANEXO 1: TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO.....	65
ANEXO 2. PLANO DE ESTÁGIO	70
ANEXO 3. TERMO ADITIVO DO TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO	71
ANEXO 4. PLANO DE ESTÁGIO ADITIVO	73
ANEXO 5: FICHA DE CONTROLE DE FREQUÊNCIA	74
ANEXO 6: FICHA DE AVALIAÇÃO NO LOCAL DE ESTÁGIO	78

1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados da Organização Mundial da Agricultura e Alimentação - FAO (2013) a produção mundial de leite caprino foi estimada em 15.855.612,20 toneladas no ano de 2011, sendo que a Índia é o maior produtor mundial e a França o país de maior produtividade com 697,5 kg/cabra/ano. O Brasil ocupou o 21^a lugar, com produção de 148.149 toneladas de leite, apresentando uma produtividade média de 30 kg/cabra/ano.

Assim como o leite de diversas espécies, o leite caprino é caracterizado como um alimento nobre de alto valor nutritivo. Porém esse leite se destaca em relação ao leite bovino por suas propriedades de maior digestibilidade e menor alergenicidade para o consumo humano, sendo bastante indicado a crianças e idosos, que normalmente, possuem maior dificuldade na digestão dos alimentos. Com a preocupação cada vez maior da população com a qualidade dos produtos alimentícios, o leite caprino tem conquistado cada vez mais adeptos, que vem reconhecendo os benefícios das propriedades desse tipo de leite ao incluí-lo na alimentação.

As principais proteínas presentes no leite são as caseínas Alfa (α S: α S₁ e α S₂), Beta (β) e Kappa (κ), além das proteínas do soro de leite α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (PEREZ E CALVO, 1995). Segundo Grzesiak (1997) e Greppi *et al.*, (2008) o leite caprino possui, em geral, teores de proteínas totais menores do que o leite de vaca. Porém as proporções das frações das caseínas são diferentes, como por exemplo, a fração da α S₁-caseína do leite de cabra é menor do que do leite bovino e a fração de β -caseína é maior, já as proporções de κ -caseína e α S₂-caseína são semelhantes entre estes dois leites (GREPPI *et al.*, 2008; WALSTRA; JENNES, 1984 e LAWRENCE 1993 *apud* COELHO, 2012). A fração de caseína do leite influencia na firmeza da coalhada, retenção de umidade e o rendimento do queijo. Por essas razões o leite de cabra tem baixo rendimento na fabricação de queijos. Os baixos teores da α S₁-caseína do leite caprino favorece a melhor digestão do leite caprino pelo organismo humano comparado ao leite bovino (WALSTRA e JENNES, 1984). A melhor digestibilidade também é facilitada por seus glóbulos de gordura diferenciados e pelos ácidos graxos de cadeia curta e média, que propiciam melhor ação enzimática (FURTADO, 1985). Além das composições bioquímicas de melhor digestibilidade, os menores níveis de α S₁-caseína do leite de cabra estão

associados à menor alergenicidade em crianças, sendo em muitos casos, utilizado como substituto ao leite de vaca (SILVA *et al.*, 2007).

A fraude em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas tem sido um grande problema econômico e de saúde pública. A adição de leite de vaca em leite de cabra e de ovelha, uma fraude relativamente comum entre alguns produtores de queijo, pode ser motivada pelas variações sazonais na disponibilidade do leite de cabra, a baixa produtividade desse leite, o menor rendimento na fabricação de produtos lácteos, como o queijo e o preço mais elevado, comparativamente ao leite de vaca (BEER *et al.*, 1996; PLATH *et al.*, 1997 e FAOSTAT, 2013).

Diversos métodos são utilizados em pesquisas para a detecção de fraude, os mais utilizados em adulterações em leite são os métodos cromatográficos, imunológicos, reação em cadeia de polimerase - PCR e eletroforéticos. A separação, quantificação, identificação e nomenclatura de proteínas de leite foram conseguidas a partir da separação por meio de técnicas eletroforéticas (FARRELL *et al.*, 2004). As técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e Ureia-PAGE são as comumente utilizadas para a separação e identificação em estudos e análises das proteínas do leite (ANEMA, 2009). Os métodos de eletroforese tradicionais têm a desvantagem de gastar muito tempo para a preparação das amostras, tanto a separação física das proteínas como a integração final e a quantificação dos componentes individuais das proteínas. O SDS-PAGE pode demorar horas ou dias, devido à necessidade da preparação de amostras e géis, tempo da corrida eletroforética das amostras nos géis, revelação por coloração das proteínas e descoloração. Além disso, a separação também pode usar grandes volumes de materiais, tais como tampões e solventes, muitos os quais são tóxicos. Por exemplo, no caso da técnica de SDS-PAGE há requerimento de vários litros de materiais, sendo utilizadas desde soluções de acrilamida, “buffers” (soluções tampões) e de coloração e descoloração de soluções que contêm álcoois e ácidos (ANDREWS, 1983 e CREAMER, 1991 *apud* ANEMA, 2009).

O método de separação e quantificação de proteína do leite por eletroforese microfluídica “Lab-on-a-chip” (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) vem sendo muito utilizado em análises da composição das principais proteínas do leite (ANEMA, 2009). Essa técnica é baseada na tradicional eletroforese em gel de

poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os reagentes utilizados são do kit Agilent Protein 80. A análise das proteínas do leite é realizada através da corrida eletroforética que ocorre em um *chip*. As informações geradas são processadas, automaticamente, no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer. As vantagens deste método em comparação ao SDS-PAGE convencional incluem rapidez, reprodutibilidade e robustez em um único método, substituindo a eletroforese em gel. O *chip* e o *kit* já possuem todos os reagentes necessários, permitindo evitar gasto de tempo e contato com elementos tóxicos (ANEMA, 2009).

A procedência e a garantia do que se está consumindo é uma exigência cada vez mais comum entre a população. Para atender essa demanda do consumidor, é necessária a aplicação intensa de fiscalização. Mas para que isso aconteça, métodos precisos, de aplicação e resultados rápidos devem ser empregados na investigação da qualidade dos alimentos. Dessa forma os órgãos competentes poderão intensificar os exames de rotina na identificação de fraudes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar testes preliminares para avaliar o método eletroforético microfluídico "Lab-on-a-chip" utilizando o aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer associado ao kit Protein 80 na detecção de fraude de leite caprino com adição de leite bovino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade do método "Lab-on-a-chip" na detecção de fraude em leite caprino com adição de leite bovino;
- Quantificar as proteínas totais de amostras de leite caprino com adição de leite bovino em crescentes proporções;
- Testar diferentes diluições das amostras com as misturas de leite caprino e bovino, para avaliar a sensibilidade da tecnologia "Lab-on-a-chip";
- Analisar o perfil eletroforético das caseínas αS_1 , β , κ das amostras de leite caprino e leite bovino e das misturas dos leites das duas espécies através do software 2100 Expert.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DADOS DE PRODUÇÃO

3.1.1 Leite Caprino

Segundo a base estatística da Organização Mundial da Agricultura e Alimentação - FAOSTAT (2013), o rebanho caprino leiteiro mundial foi estimado em 168.168.384 animais em 2011, já a produção mundial de leite caprino foi estimada em 15.855.612,20 toneladas neste mesmo ano. Na TABELA 1 é apresentado o *ranking* dos cinco maiores países produtores de leite caprino. A Índia é o maior produtor mundial, seguida por Bangladesh, Paquistão, Mali e França, que juntos produzem 58,1% do total mundial produzido em 2011. Entre os cinco maiores produtores, a França se destaca por sua maior produtividade média, que é de 697,5 kg/cabra/ano, sendo 4,6 vezes maior que a produtividade média da Índia, a maior produtora em volume. O Brasil se encontra na 21ª posição, com um rebanho caprino leiteiro de 4.938.300 cabras, responsáveis pela produção de 148.149 toneladas de leite, apresentando uma produtividade média de 30 kg/cabra/ano (FAOSTAT).

TABELA 1. *Ranking* dos principais países produtores de leite caprino no mundo.

	País	Produção de leite (Toneladas)	%	Rebanho Leiteiro (nº cabras)	%	Produtividade Média (kg/cabra/ano)
1º	Índia	4.594.000,0	29,0	30.500.000	18,1	150,6
2º	Bangladesh	2.496.000,0	15,7	31.200.000	18,6	80,0
3º	Paquistão	759.000,0	4,8	5.400.000	3,2	140,6
4º	Mali	702.617,0	4,4	11.710.300	7,0	60,0
5º	França	657.146,0	4,1	942.118	0,6	697,5
21º	Brasil	148.149,0	0,9	4.938.300	2,9	30,0
	Total Mundial	15.855.612,2	100%	168.168.384	100	

Fonte: FAOSTAT (2013), dados trabalhados.

Ao analisar os dados históricos de produção de leite caprino no Brasil, verifica-se que nos últimos 15 anos a produção deste produto cresceu a uma taxa média de

1,91% ao ano (figura 1). Segundo as projeções da FAO, a produtividade média nestes anos se manteve igual, sendo de 30 kg/cabra/ano (TABELA 1).

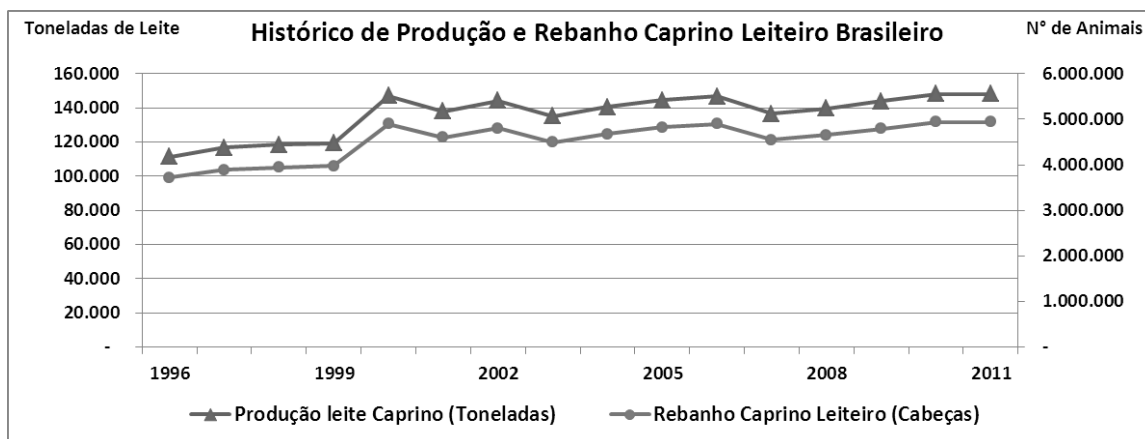


Figura 1. Série histórica de produção e rebanho caprino leiteiro no Brasil 1996-2011.

Fonte: FAOSTAT (2013).

3.1.2 Leite Bovino

Segundo a base estatística da Organização Mundial da Agricultura e Alimentação - FAOSTAT (2013), o rebanho bovino leiteiro mundial foi estimado em 253.467.010 animais em 2011, já a produção mundial de leite bovino foi estimada em 606.660.838,7 toneladas neste mesmo ano. Na TABELA 2 é apresentado o *ranking* dos cinco maiores países produtores de leite bovino. O Estados Unidos é o país com maior produção mundial, seguido pela Índia, China, Brasil e Rússia, que juntos produzem 39,9% do total mundial produzido em 2011. Além de ser o maior produtor mundial de leite bovino, os Estados Unidos se destacam por sua maior produtividade média, 9.677,7 kg/vaca/ano, sendo 8,3 vezes maior que a produtividade média da Índia, a segunda maior produtora em volume. O Brasil se encontra na 4ª posição deste *ranking*, com um rebanho bovino leiteiro de 23.227.200 vacas, responsáveis pela produção de 32.091.000 toneladas de leite, apresentando uma produtividade média de 1.381,6 kg/vaca/ano.

TABELA 2. *Ranking* dos principais países produtores de leite bovino no Mundo.

	País	Produção de Leite (Toneladas)	%	Rebanho Leiteiro (nº vacas)	%	Produtividade Média (kg/vaca/ano)
1º	Estados Unidos	89.015.200,0	14,7	9.198.000	3,6	9.677,7
2º	Índia	52.500.000,0	8,7	44.900.000	17,7	1.169,3
3º	China	36.928.901,0	6,1	12.297.299	4,9	3.003,0
4º	Brasil	32.091.000,0	5,3	23.227.200	9,2	1.381,6
5º	Rússia	31.385.700,0	5,2	8.136.900	3,2	3.857,2
	Total Mundial	606.660.838,7	100	253.467.010	100	

Fonte: FAOSTAT (2013), dados trabalhados.

Os dados históricos de produção de leite bovino no Brasil mostram que nos últimos 15 anos a produção de leite bovino cresceu a uma taxa média de 3,52% ao ano. Segundo as projeções da FAO a produtividade média nestes anos cresceu, passando de 1.173 kg/vaca/ano em 1996 para 1.381,6 kg/vaca/ano em 2011 (figura 2).

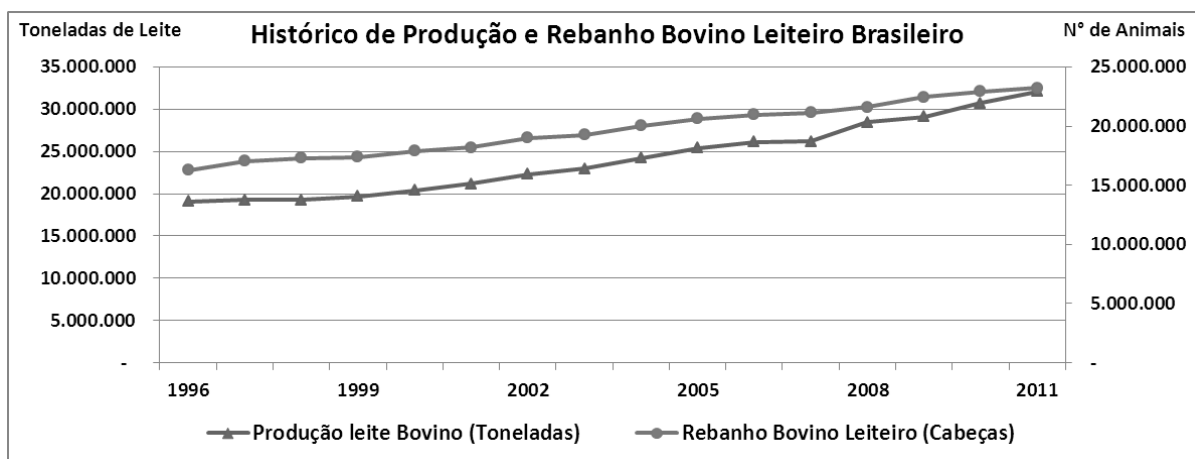


Figura 2. Série histórica de produção e rebanho bovino leiteiro no Brasil 1996-2011.
Fonte: FAOSTAT (2013).

Através dos dados de produção de leite no Brasil, pode-se verificar que a produção de leite de vaca é mais de 216 vezes maior que a produção de leite de cabra.

3.1.3 Dificuldades da Caprinocultura Leiteira no Brasil

A caprinocultura leiteira brasileira vive uma realidade de problemas de viabilidade econômica (FONSECA e OLIVEIRA, 2011). Esse fato pode ser constatado através dos dados de produção e produtividade (TABELA 1). Em razão da rusticidade da espécie caprina muitos produtores submetem os animais a condições de baixa qualidade de alimento e pouca atenção sanitária e ao manejo, com isso não há exploração dos possíveis potenciais genéticos dos animais de maior produtividade. Segundo Fonseca e Oliveira (2011) a inviabilidade da atividade está associada à falta de conhecimento prévio e comprometimento, e que o gerenciamento junto ao processo produtivo também é um fator limitante para o sucesso da atividade. Em geral os produtores encontram dificuldades em adotar uma postura empresarial em relação à produção de leite caprino, acarretando em uma produção ineficiente prejudicando a organização da cadeia produtiva. A produtividade de leite caprino na França é 23 vezes maior que a produtividade desse leite no Brasil (TABELA 1). Isso mostra que o país tem potencial de crescimento nesta atividade. A caprinocultura leiteira brasileira necessita ter seu desempenho zootécnico melhorado, para isso deve haver além de conhecimento sobre a cultura, comprometimento e profissionalismo, os empresários devem trabalhar seus custos de produção e outros fatores produtivos.

Segundo Fonseca e Oliveira (2011) entre as principais práticas que os produtores devem adotar para alavancar sua produção de leite caprino são:

- Realizar treinamento e qualificação de sua mão-de-obra.
- Utilizar alimentos de boa qualidade, considerando as exigências nutricionais de cada categoria animal.
- Adaptar as instalações de acordo com as necessidades e comportamento dos caprinos leiteiros.
- Realizar manejo reprodutivo.
- Estabelecer áreas da propriedade para o cultivo de volumosos
- Definir a quantidade de matrizes e categorias animais.
- Considerar a logística da entrada de insumos e escoamento da produção.
- Adotar estratégia de compras de insumos dentro do período de safra do produto
- Empregar programa de melhoramento genético

Além disso, é essencial o acompanhamento de um técnico da área para orientar todo processo produtivo (FONSECA e OLIVEIRA, 2011). A adoção desses e outros requisitos podem fortalecer a cadeia produtiva e mudar a realidade do setor.

O pequeno volume de produção de leite de cabra juntamente com as dificuldades da caprinocultura leiteira e sua baixa rentabilidade podem explicar em parte a motivação da existência de adulteração do leite de cabra. Além de inibir as fraudes de leite caprino com maior fiscalização, a melhoria das condições produtivas também pode contribuir com a redução desse tipo de fraude.

3.2 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE CAPRINO VERSUS LEITE BOVINO

O leite de cabra tem a característica de ser bastante branco. A cor mais branca do que o leite bovino se deve ao fato do leite de cabra não conter β -carotenos responsáveis pela tonalidade amarelada da gordura do leite de vaca (BELANGER, 1990). Além disso, o leite caprino possui maior viscosidade que o leite de vaca, pode ser consumido *in natura*, sendo também muito usado para a fabricação de queijos (BELANGER, 1990). O sabor é agradável e característico, mas o tipo de alimentação ofertado aos animais pode alterar seu sabor. O odor é bastante neutro, a presença de cheiro desagradável de cabrito é ocasionada por más condições de manejo no momento da ordenha (BELANGER, 1990).

Os valores de análises dos teores da composição do leite, comparando leite de diferentes espécies, variam bastante entre trabalhos. Essa variação pode ser explicada em parte pela influência do período de lactação, idade do animal, volume de produção de leite, alimentação, estação do ano entre outros fatores. Os resultados da composição do leite encontrados por Grzesiak (1997) apresentados na TABELA 3 mostram que alguns componentes do leite de cabra são semelhantes ao de vaca, já a porcentagem de proteína total e de gordura são menores.

TABELA 3. Composição química do leite de cabra e de vaca.

Componentes (%)	Cabra	Vaca
Água	87	87,6
Proteína	2,7	3,1
Gordura	3,5	3,8
Lactose	4,6	4,7
Minerais	0,6	0,6

Fonte: Grzesiak, 1997

Algumas propriedades físico-químicas do leite caprino também diferem do leite bovino, como a maior percentagem de glóbulos de gordura menores do que 1,5 microns, que confere maior dispersão dos glóbulos. O leite caprino contém 28% desses glóbulos, enquanto o leite de vaca apenas 10%. Essa característica explica em parte a digestibilidade facilitada do leite caprino (FURTADO, 1985). Este dois leites contam também com diferentes proporções de proteínas, de acordo com a TABELA 3, interferindo tanto na aplicação de tecnologias na produção de produtos lácteos, como também a ocorrência de processos alérgicos em crianças. (GRZESIAK, 1997 e LOWRY, 2002 *apud* JACOPINI, *et al.*, 2011).

De acordo com as propriedades físico-químicas e estruturais as proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e enzimas. As caseínas e as proteínas do soro possuem qualidade nutricional e a aptidão para processos industriais que geram ampla aplicação e valor econômico dos produtos derivados do leite (SGARBIERI, 1996). As caseínas são formadas em quatro subgrupos, incluindo as caseínas alfa (α), beta (β), kappa (κ) e gama (γ), as quais as frações proteicas no leite bovino correspondem em 45 a 55%, 25 a 35%, 8 a 15% e 3 a 7%, respectivamente. A fração de maior representação, as caseínas α são agrupadas em duas famílias, a αS_1 e a αS_2 . A αS_1 é constituída em dois tipos αS_0 e αS_1 , as sequências de aminoácidos de suas estruturas primárias são iguais. A família αS_2 é constituída por cinco tipos (αS_2 , αS_3 , αS_4 , αS_5 e αS_6). Cada grupo dessas caseínas contém ainda variantes genéticas. Essas proteínas são determinadas pelas diferentes mobilidades eletroforéticas (SGARBIERI, 2005). Segundo Pardo (2002) e Walstra (1999) as proteínas de maior relevância para a produção de derivados do

leite são as caseínas (α S: α S₁ e α S₂), β e κ e proteínas do soro: β -Lactoglobulina (β -LG) e α -Lactalbumina (α -LA).

Dispostos na TABELA 4, os teores das proteínas totais do leite de cabra são mais baixos em comparação ao leite de vaca, variando entre 28-32 g/L contra 32-34 g/L no leite bovino. As proteínas do soro correspondem 5,5-6,5 g/L do leite de cabra e 5,8-6,5 g/L do leite de vaca, sendo que a α -LA, β -LG e Imunoglobulinas (IG) estão em maior proporção dessa fração proteica (GREPPI *et al.*, 2008). As caseínas são os principais componentes das proteínas totais, com 22-28 g/L no leite de cabra e 26-37 g/L no leite de vaca. As proporções de κ -caseína e α S₂-caseína do leite de cabra são semelhantes ao da vaca, porém, o leite de cabra contém níveis mais elevados de β -caseína. Já a porcentagem de α S₁-caseína e β -Lactoglobulina são menores no leite caprino (GREPPI *et al.*, 2008; WALSTRA e JENNES, 1984 e LAWRENCE 1993 *apud* COELHO, 2012).

TABELA 4. Composição das proteínas de leite de cabra e leite de vaca.

	Cabra g/L	Vaca g/L
Proteínas Totais	28-32	32-34
Caseínas	22-28	26-37
α S ₁ -Caseína	10	11-15
α S ₂ -Caseína	3	3-4
β -Caseína	11	9-11
κ -Caseína	4	2-4
Proteínas do Soro	5,5-6,5	5,8-6,5
α -Lactoalbumina	1,2	0,6-1,5
β -Lactoglobulina	3,1	3-4
Imunoglobulina	1,0	1,0

Adaptado: Greppi *et al.*, 2008

Segundo Sgarbieri (2005) as caseínas, particularmente α S₁, α S₂ e β , são proteínas de estruturas abertas com maior parte em estruturas primárias, possuem estruturas flexíveis com baixo grau de estrutura secundária (α -hélice), o que se deve, em parte, ao elevado conteúdo de prolina distribuída na cadeia polipeptídica. De acordo com o mesmo autor as proteínas do soro apresentam estruturas terciárias, sendo moléculas solúveis. As estruturas terciárias, contem formas secundárias em α -hélice e folhas β , a estrutura primária está intercalada nesse meio.

Sua resistência ao tratamento térmico é baixa, sofre vários graus de desnaturação em temperaturas acima de 70°C.

Conforme Bylund (1995); Walstra (1999); Sgarbieri (2005) as caseínas são fosfoproteínas que formam micelas esféricas, constituídas por unidades menores (submicelas), como ilustrado na figura 3. As submicelas são compostas pelas caseínas αS_1 , αS_2 , β -caseína e κ -caseína, juntamente com fosfato de cálcio e glicomacropeptídeo (GMP), conectadas por um conjunto de fosfato de cálcio até atingir a forma micelar. As micelas possuem dois tipos de formação, um formado pelas caseínas αS , β e κ e outro formado pelas caseínas αS e κ . A formação da micela acontece de maneira em que as submicelas formadas pelas caseínas αS e β se posicionam na região central das micelas, e o grupo de caseína αS e κ se distribui em sua superfície. Segundo esses autores a κ -caseína é apolar, por esse motivo a sua região de sequência primária se direciona para dentro das micelas, interagindo com as caseínas αS e β situadas no núcleo da micela, através de grupos hidrofóbicos. As caseínas αS e β são sensíveis ao Ca^{+2} por ação dos sais de cálcio do leite, mas estão preservadas de precipitação, pois a κ -caseína não se solubiliza na presença de Ca^{+2} . Os autores afirmam também que o glicomacropeptídeo se encontra associada à região carboxiterminal da κ -caseína, orienta-se para a fase soro, interagindo com a água, pois é uma molécula polar. Essas disposições das caseínas, do GMP, juntamente com as ligações de fosfato de cálcio, atribuem forma, estabilidade físico-química e consistência às micelas

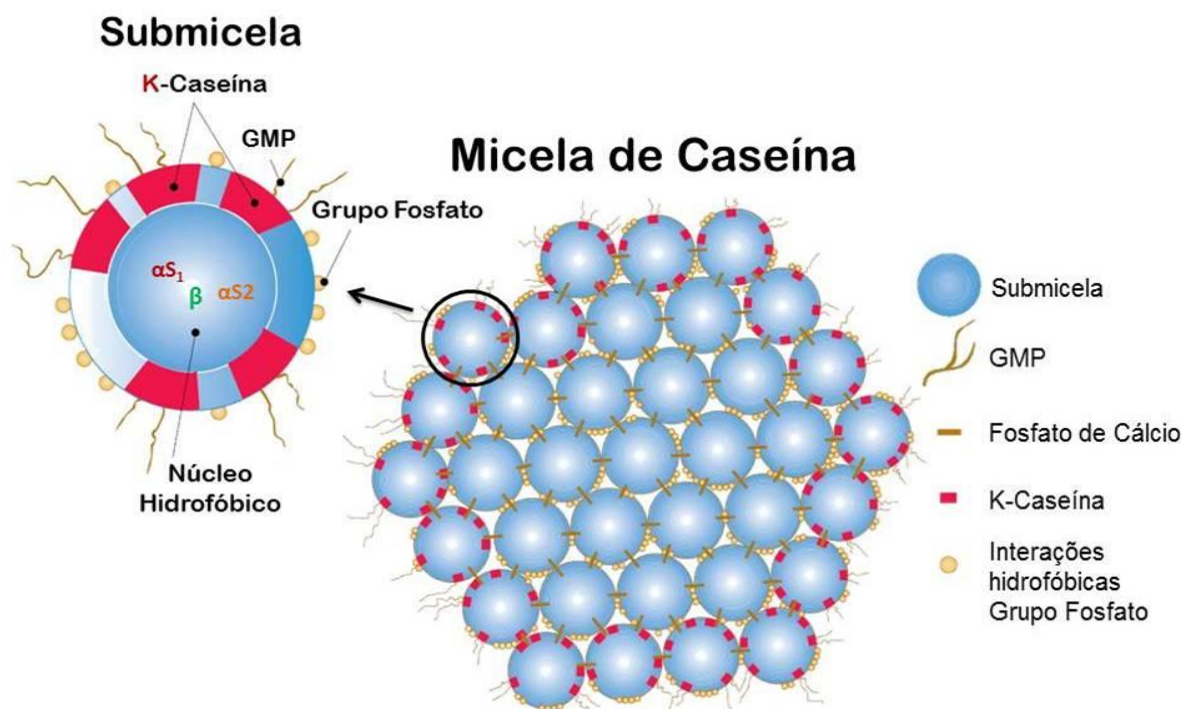


Figura 3. Estrutura das micelas de caseína do leite.
Adaptado: Bylund, 1995.

As enzimas utilizadas para as reações de hidrólise na produção de queijos ou as altas temperaturas dos tratamentos térmicos do leite, resultam na dissociação da κ -caseína, desestabilizando a conformação da micela (SGARBIERI, 2005). As cadeias de aminoácidos da κ -caseína são quebradas por proteases, como a renina, também conhecidas como quimosina. A lise da κ -caseína origina a para- κ -caseína insolúvel, que permanece agregada à micela de caseína e um peptídeo solúvel, parte residual da caseína, o caseinomacropéptido (CMP). Sem a ação estabilizadora da κ -caseína, as frações α , β e para- κ -caseína são expostas ao cálcio, precipitam e são transformadas no paracaseinato de cálcio, ocorrendo a separação do soro e precipitado (MAGALHÃES, 2008). Quando a hidrólise da κ -caseína atingir 86%, a coagulação do leite será formada (GUINEE *et al.*, 1992).

3.3 IMPORTÂNCIA DO LEITE DE CABRA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Além do valor nutritivo e suas propriedades de maior digestibilidade, muitos estudos vem demonstrando, que o leite caprino é indicado para vários tratamentos. Diversos trabalhos sobre a alergia à proteína do leite de vaca (APLV) têm sido apontados. A APLV ocorre com maior frequência em crianças, com uma incidência de 2 a 6% das crianças (HOSKING *et al.*, 2000 *apud* LARA-VILLOSLADA *et al.*, 2005). Segundo Bevilacqua *et al.* (2001) a maioria dos casos de alergia a proteína do leite de vaca em crianças estão relacionados, principalmente, com a α S₁-caseína (α -CN) e β -Lactoglobulina (β -LG). Esse fato se deve aos altos níveis de α S₁-caseína do leite de vaca. O leite caprino muitas vezes é indicado em tratamento de APLV, devido ao seu menor teor de α S₁-caseína em relação ao leite da vaca (15% versus 38%) e a menor percentagem de proteínas do soro do leite de cabra em relação ao leite de vaca, sendo 0,43 e 0,60%, respectivamente (RIBEIRO, 1997 *apud* RIBEIRO, 2001). Os autores Bevilacqua *et al.* (2001) e Lara-Villoslada *et al.* (2004) demonstraram uma diminuição de sensibilização a α -CN e β -LG com o uso de leite de cabra. Para reduzir a alergenicidade em tratamento de APLV, também é indicado uma proporção menor de caseína:proteína (40:60) de leite de vaca em fórmulas lactantes, diminuindo assim o componente α -caseína (LARA-VILLOSLADA *et al.*, 2005). Outra característica benéfica do leite de cabra de menor alergenicidade se refere ao polimorfismo genético das proteínas do leite de cabra (BEVILACQUA *et al.*, 2001). O gene CSN1S1 caprino relativo à α -caseína apresenta o maior grau de variabilidade de todos os genes de caseína de ruminantes já estudados (MORAES *et al.*, 2010).

Woodford (2007) relata que vacas de raças europeias apresentam uma mutação que originou uma variante da caseína chamada β -caseína A1 ocorrida entre 5000 a 10.000 anos atrás. Essa variante tem sido associada a diversos problemas de saúde em humanos, como diabetes do tipo 1, doenças do coração, esquizofrenia, autismo e reações alérgicas. O autor relata que criadores de bovinos da raça holandesa da Nova Zelândia estão selecionando seus animais para eliminar a produção de β -caseína A1 do leite. Eles estão buscando inserir o gene A2, gene favorável, para valorizar seus animais. No entanto, além do resultado do melhoramento genético ser obtido em longo prazo, a grande maioria dos países de maior desenvolvimento científico e tecnológico, com pouquíssimas exceções, não se

verifica a preocupação por parte dos produtores, na seleção para essa característica em seu rebanho. Em razão do potencial produtivo das raças de vacas holandesas, e consequentemente o maior volume de leite dessa raça sendo produzido, acredita-se que a maior parte do leite de vaca ofertado à população possua a variante A1. De acordo com a ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES GAÚCHOS DE ZEBÚ (2012) as raças de vacas zebuínas entre outras, apresentam baixa frequência desse gene.

3.4 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO LEITE CAPRINO NA FABRICAÇÃO DE QUEIJO

Vários fatores interferem nas propriedades físico-químicas do leite de cabra, tais como o clima, estação do ano, alimentação, saúde do animal, idade, número de partos, fase de lactação, raça e genética dos animais (JENOT, 2000 *apud* COELHO, 2012). Porém se as boas práticas de produção são utilizadas no manejo dos animais e na ordenha, o leite caprino apresentará propriedades peculiares que contribuem para a fabricação de queijo diferenciado, por apresentar melhor e maior digestibilidade comparado com os produtos lácteos dos bovinos.

Os baixos teores da αS_1 -caseína do leite de cabra interferem na aplicação de tecnologias na produção de produtos lácteos. Influencia na formação do coalho, torna-o mais fraco e menos compacto que o do leite de vaca (GRZESIAK, 1997), resultando em uma coalhada mais fina e macia. No entanto, os baixos níveis de proteínas totais e caseínas levam a um menor rendimento de queijo caprino comparado ao queijo bovino. Os níveis de gorduras e lactose são semelhantes, porém, no leite de cabra há mais glóbulos de gordura de diâmetros menor, o que permite existir maior dispersão dos glóbulos (FURTADO, 1985). Também possui mais ácidos graxos de cadeia curta e média, propiciando melhor ação enzimática. Essas características possibilitam o leite e queijo caprino ser mais facilmente digerido pelo organismo humano e confere ao queijo um sabor pronunciado e um aroma característico (RIBEIRO, 2001).

3.5 ADULTERAÇÃO E FRAUDE EM LEITE

A legislação do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1952) conforme o artigo 543 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA considera fraudado, adulterado ou falsificado o leite que for adicionado de quaisquer substâncias de qualidade, tipo e espécies diferentes da composição normal do produto. A legislação também julga como fraude as operações de manipulações e elaborações executadas com a intenção deliberada de estabelecer falsa impressão aos produtos fabricados. Os tipos mais comuns de adulterações e fraudes do leite incluem adição de água, soro, reconstituintes, neutralizantes, conservantes, leite de espécies diferentes, gorduras não lácteas, alteração da composição e troca de data de validade (BRANDÃO, 2012).

O leite de cabra é comumente fraudado com leite de outras espécies, principalmente com a utilização de leite bovino, em substituição de parte do leite caprino. O alto valor agregado, a maior oferta do leite de vaca, aliados a dificuldade da identificação desse tipo de fraude, em razão das semelhanças entre esses produtos são alguns dos possíveis motivos da existência desse tipo de fraude (EGITO *et al.*, 2006). Análises de 66 amostras de leite de cabra a granel produzido por pequenos produtores da Paraíba mostraram que 41,2% das amostras foram adulteradas com leite bovino (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A mistura de leite e/ou proteínas lácteas de diferentes espécies, pode limitar a utilização do leite de cabra, prejudicando o uso como um produto diferenciado, por não se poder garantir a credibilidade do produto, se tornando um grande problema de saúde pública. As importantes propriedades do leite caprino tanto para a fabricação de derivados quanto para os benefícios terapêuticos, geram um aumento da demanda do produto. Portanto é preciso investimentos da indústria e políticas públicas no desenvolvimento tecnológico e maior fiscalização da composição desse tipo de produto para proporcionar maior segurança aos consumidores. Para a detecção de adição de leite bovino em queijos de búfalo, cabra ou de ovelha, a União Europeia utiliza como método oficial a técnica de focagem isoelétrica da γ -caseína, após tratamento das caseínas com plasmina, na presença de ureia, e coloração das proteínas (UNIÃO EUROPEIA, 2008). Apesar da importância do leite de cabra, a legislação Brasileira ainda não possui um método oficial validado para

detecção de fraude do leite de caprino com adição de leite de bovino (EGITO *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de tecnologias automatizadas que apresente rápido resultado e possua melhor biossegurança, traz melhorias à qualidade dos produtos, permite maior segurança aos funcionários de laboratório, sendo mais indicados para melhorar a eficiência de fiscalizações na identificação de fraudes em alimentos.

3.6 TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE COM MISTURAS ENTRE LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES

3.6.1 Método espectrofotométrico

A quantificação de proteína é muitas vezes necessária no auxílio a outros métodos para o isolamento, a separação e a análise de proteínas. No doseamento das proteínas totais do leite e produtos lácteos os métodos mais utilizados são o método de Kjeldahl (HELRICH, 1990), os métodos por fixação de corante, a espectrofotometria de infravermelho (IV) e ultravioleta (UV). Um estudo realizado por Kamizake (2003) mostrou que o método de Bradford apresenta maior sensibilidade em relação a outros métodos comumente utilizados na quantificação de proteínas, como o de Lowry e Kjeldahl. A técnica de Bradford é baseada na absorção de luz a 595 nm, produzida pelo resultado da interação entre as proteínas e o corante Comassie Blue BG-250 (CBB). O corante interage com o grupamento R de aminoácidos específicos da proteína. Inicialmente o corante tem cor vermelha, após a ligação entre proteínas e o CBB, o corante é convertido na cor azul. A correlação entre a quantidade de proteína da amostra e a intensidade da cor azul pode ser avaliada qualitativamente a olho nú e/ou medida quantitativamente com espectrofotômetro. Os valores de absorbância fornecidos pelo espectrofotômetro juntamente com os valores conhecidos de concentração de proteína do padrão utilizado, em geral a soro albumina bovina, são utilizados para elaborar a curva de calibração e determinar o coeficiente de correlação (R^2) (BRADFORD, 1976 e KAMIZAKE, 2003).

3.6.2 Método Cromatográfico

Os métodos cromatográficos são muito utilizados na detecção de fraude de alimentos. Constituem de um conjunto de instrumentos de laboratório com a função de identificar, quantificar ou purificar componentes de uma mistura. Existem diversas técnicas fundamentadas na cromatografia, criada inicialmente pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett em 1906 e que foram sendo aperfeiçoadas ao longo do tempo. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) é um exemplar desse sistema. De acordo com Niero e Malheiros (2010) e Magalhães (2008) a técnica consiste em uma fase móvel que dissolve a amostra em um líquido sem interação química e a fase estacionária. A fase estacionária está inserida em uma coluna com elementos sólidos podendo ser rígidos (à base de sílica), semi-rígidos (poliestireno entre cruzado com divinilbenzeno) ou não rígidos (agarose ou dextrose), na qual as moléculas das amostras irão interagir. A composição dos elementos sólidos e a temperatura do sistema também influenciam no processo de separação. Geralmente o sistema é composto por um reservatório, bombas, um detector e um registrador. O reservatório faz a mistura da amostra na fase móvel. As bombas fornecem o fluxo para que a composição da fase móvel passe através da coluna da fase estacionária, no qual cada componente é seletivamente retido. Os detectores geram um sinal proporcional à quantidade dos componentes de interesse, os mais usados são os espectrofotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta, permitindo a análise quantitativa das moléculas da amostra. A análise dos dados pode ser feita por um processador e software que compõem o aparelho de CLAE. Esse modelo se distingue da cromatografia de "baixa pressão", pois a pressão exercida pelo sistema de CLAE é obtida com auxílio de uma bomba de alta pressão, propiciando uma vazão significativamente mais elevada, enquanto que a cromatografia de "baixa pressão" depende da força da gravidade, exercida pela pressão atmosférica, para dessa forma passar a fase móvel através da coluna. O sistema CLAE também possui a vantagem de apresentar melhor resolução entre outros aprimoramentos.

A técnica CLAE pode ser aplicada na análise de diversas componentes como aminoácidos, lipídeos polares, pigmentos de plantas, polissacarídeos, proteínas entre outros (NIERO e MALHEIROS, 2010). Ferreira e Caçote (2003) avaliaram diferentes proporções de adição de leite bovino em leite e queijo caprino e ovino

utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC). Os autores verificaram diferentes perfis cromatográficos da proteína β -lactoglobulina nas amostras de leite e queijo de vaca, cabra e ovelha, com adição de leite de vaca a partir de 2% (v/v), com isso concluíram que o HPLC é um método adequado para detectar misturas de leites de diferentes espécies. A Legislação Brasileira que regulamenta os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos (IN Nº68/2006) adotou método CLAE com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta para detectar e quantificar a adição fraudulenta de soro de leite ao leite através da presença do fragmento caseinomacropeptídeo (CMP) no leite analisado (MAGALHÃES, 2008).

3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) inovou as pesquisas de genética e biologia molecular. Essa tecnologia teve grande importância para o avanço de pesquisas com genes individuais como os marcadores moleculares. Contribuiu com os estudos de genética de populações, incluindo a variabilidade genética, os padrões de migração, a seleção e a deriva genética. Também tem sido determinante na evolução de pesquisas com doenças humanas. O método consiste na replicação do DNA *in vitro*, amplificando a sequência de DNA de interesse. Antes de amplificar o fragmento determinado, é preciso isolar o DNA de acordo com protocolos específicos para cada tipo de material biológico. Os componentes que fazem parte da reação de PCR incluem a DNA-polimerase (enzima termoestável), iniciadores ou *primers*, solução tampão e desoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP). Com esses elementos é feita uma mistura, conhecida de pré-mix, a qual o DNA extraído é adicionado. A mistura é colocada em um aparelho termociclador, o qual desempenha a função de alternar a temperatura a cada ciclo, num total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Os *primers* atuam como ponto de início da síntese da fita de DNA complementar à fita molde, a reação é catalisada pela enzima DNA-polimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. A DNA-polimerase continua sua função catalisadora na extensão da sequência complementar de DNA utilizando os dNTPs, que são as bases nitrogenadas ligadas

a três fostatos. A alternância de temperatura do termociclador provoca a desnaturação, anelamento e a extensão das fitas de DNA. Ao elevar a temperatura (92°C a 95°C) ocorre a desnaturação, separando as fitas duplas, a 50-60°C acontece o anelamento dos *primers* e a 70-80°C ocorre a fase de extensão das fitas moldes, partindo da extremidade 3' de cada *primer*. A cada ciclo as fitas complementares passam a ser fita molde no próximo ciclo. Desse modo o resultado ao final de vários ciclos é o acúmulo exponencial da sequência delimitada pelos *primers*, gerando bilhões de cópias. O resultado pode ser visualizado através de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida e analisado com auxílio de um padrão de peso molecular adicionado em um dos poços do gel, o qual auxilia na identificação do tamanho do fragmento amplificado (REGITANO *et al.*, 2001; FALEIRO, 2007).

Estudos com a utilização da técnica de amplificação de DNA permitiram o melhoramento de animais de produção, antes mesmo da expressão do fenótipo, propiciando avanços significativos na produção animal. A exemplo do sucesso obtido em diversas áreas, vários pesquisadores estão adotando o método de PCR como aliado na identificação de fraude em leite com misturas de diferentes espécies. Os autores Rodrigues *et al.* (2012) empregaram a técnica de amplificação de DNA em amostras de leite caprino de uma associação de produtores em busca de possível adição de leite de vaca. A iniciativa partiu da associação na suspeita de fraude por parte de alguns produtores da região do Estado da Paraíba. Das 66 amostras analisadas 41,2% apresentaram adulteração com leite bovino. Os pesquisadores usaram os pares de *primers* BosD e GoaD para a identificação de DNA bovino e caprino, respectivamente. As amostras geraram “bandas” formadas pelos fragmentos delimitados pelos pares de *primers* relativos ao leite bovino e caprino, que foram amplificados por PCR. Através das bandas, também chamadas de *amplicons* de DNA bovino, foi possível identificar adição de leite de vaca em leite de cabra a partir de 0,5% (v/v) como ilustra a figura 4.

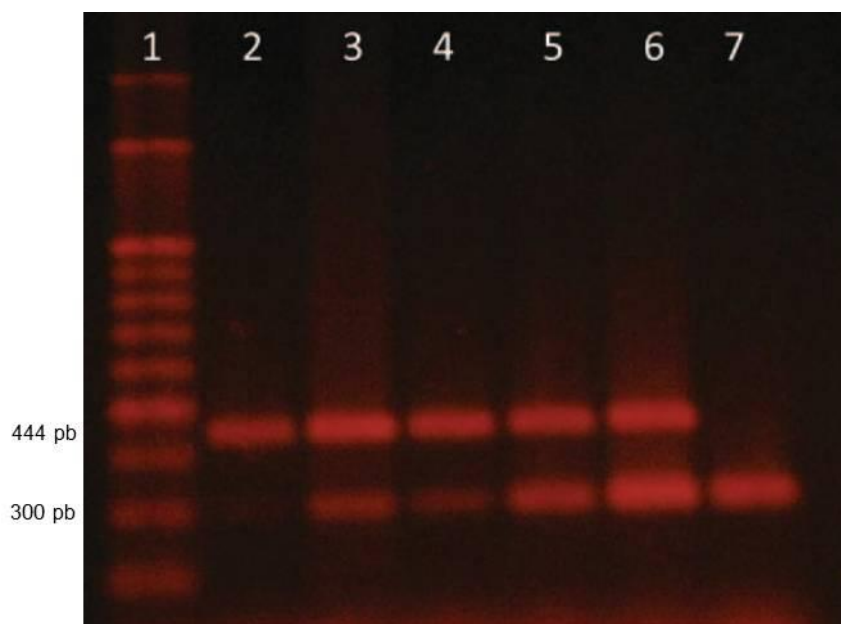


Figura 4. Gel de agarose mostrando *amplicons* de DNA na detecção de leite bovino e caprino simultaneamente.

1 - marcador molecular de 100 bp; 2 - 0,1% de leite bovino; 3 - 0,5% leite bovino; 4 - 1% de leite de vaca; 5 - 10% de leite de vaca; 6 - 50% de leite de vaca; 7 - 100% do leite bovino. Amplicons com 300 e 444 pb corresponde ao leite bovino e caprino, respectivamente. Fonte: Rodrigues *et al.*, 2012.

3.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS-PAGE, UREIA-PAGE E NATIVE-PAGE

A base do sistema do método de eletroforese utilizada atualmente para a separação de proteína foi desenvolvido em 1930 por Arn Tiselius, pesquisa que o levou a conquista do prêmio Nobel. Constantemente o método vem sendo modificado e aperfeiçoado. Existem atualmente muitas variantes da técnica de eletroforese, entretanto a eletroforese convencional por zona é a de maior aplicação. A eletroforese se fundamenta na migração de elementos carregados com cargas positivas e/ou negativas, em um meio poroso como o gel de agarose, poliacrilamida e acetato de celulose. As cargas da molécula em estudo são captadas por um campo elétrico, desse modo, são movidas em uma solução e separadas conforme o seu peso molecular. As partículas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e partículas com carga positiva, migram para o pólo negativo (cátodo). A mobilidade eletroforética é inversamente proporcional à viscosidade do meio. As moléculas de peso molecular maiores são movidas mais lentamente que as moléculas menores. Na visualização do resultado, os fragmentos maiores são

retidos anteriormente ao fragmento menor, como representado na figura 5. Esse comportamento se deve a melhor facilidade dos fragmentos menores em atravessar os poros do gel (TORRES FILHO, 2008 e ROCHA, 2005).

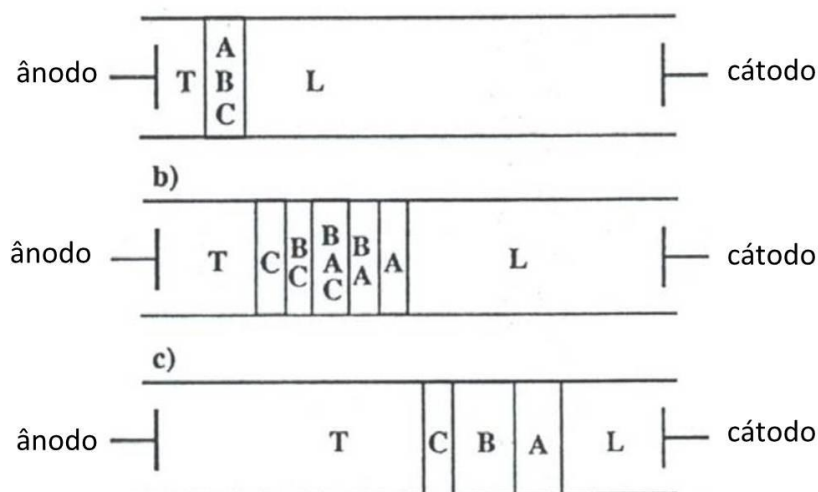


Figura 5. Representação de eletroforese para separação de moléculas.
Fonte: Assis, 2006.

O método de SDS-PAGE, é bastante utilizado em separação de proteínas do leite. O gel de poliácridamida é formado por polímero de acrilamida com ligação cruzadas de N-metil-bis-acrilamida. A porosidade da malha do gel é definida de acordo com o elemento a ser analisado. O SDS é um tipo de reagente que tem alta carga negativa e uma calda hidrofóbica, com função de carregar as proteínas negativamente. Também se utilizam agentes redutores como (ditiotreitól - DTT) ou β -mercaptoetanol) que destroem as pontes dissulfeto, responsáveis pela a estrutura original das proteínas, auxiliando na separação das cadeias polipeptídicas. Em geral o gel de poliácridamida é confeccionado entre duas placas de vidro, nesse momento são efetuadas aberturas no gel, chamados de poços, para a inserção das amostras. Após a distribuição das amostras no aparato, aplica-se a corrente elétrica, corrida eletroforética ocorre em direção ao polo positivo, devido a maior concentração de carga negativa das amostras conferida pelo reagente SDS. Os fragmentos menores migrarão mais rapidamente, enquanto os maiores se movimentarão mais lentamente, devido a maior dificuldade de se mobilizar entre a malha do gel conforme a ilustração da figura 6 (GREPPI, 2012 e ROCHA, 2005). Outro método utilizado na separação de proteína por eletroforese é a técnica de Ureia-PAGE, possui o mesmo princípio do SDS-PAGE, ou seja, a ureia tem função de desnaturar

e principalmente carregar negativamente as proteínas. Também existe a variante NATIVE-PAGE que difere somente pela ausência do agente desnaturante, que também conferiria a carga negativa às proteínas da amostra.

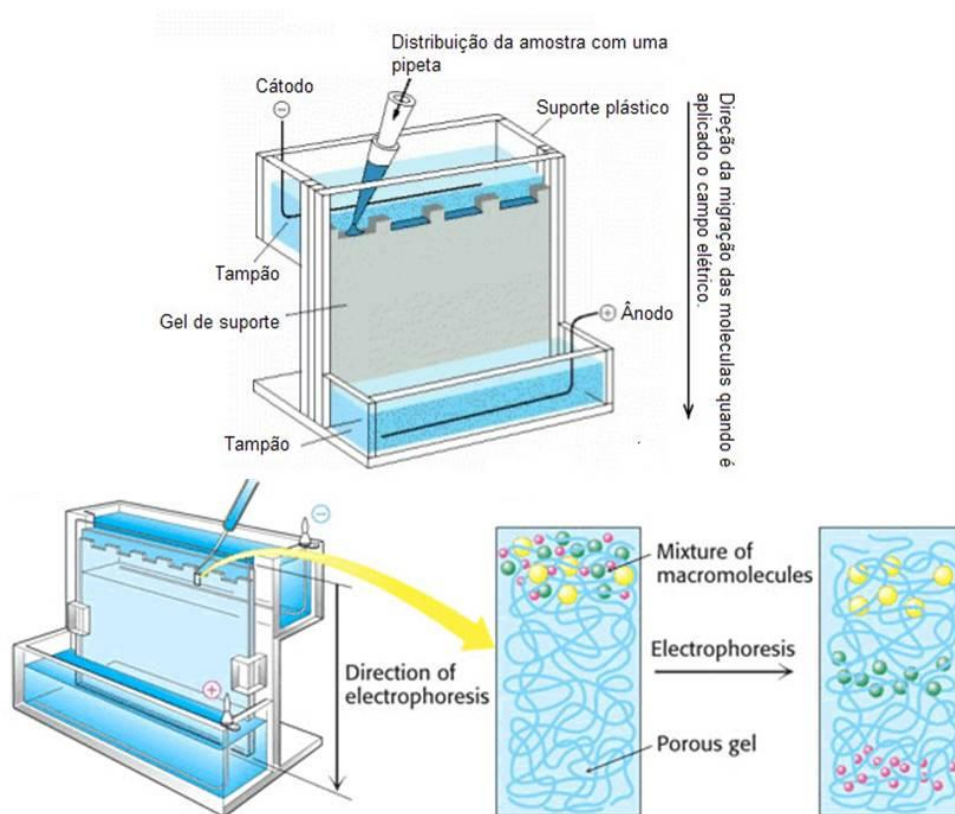


Figura 6. Aplicação de amostras de proteínas em gel de poliacrilamida.
Fonte: Adaptado Bioinformatics, 2013.

A detecção de misturas de leite de cabra, ovelha e vaca, tem sido obtida através de técnicas eletroforéticas utilizando proteínas do leite como o componente de identificação, que apresenta resultados importantes na investigação de laticínios. A eletroforese em géis de poliacrilamida permite a diferenciação das proteínas do leite de vaca do leite de ovelha e cabra (ANEMA, 2009). A figura 7 ilustra o resultado obtido por Egito *et al.* (2006) que utilizou tanto o método Ureia-PAGE figura 7A e SDS-PAGE figura 7B para separação de proteínas na detecção de fraude de leite de cabra com leite de vaca. A proteína escolhida para o estudo foi a αS_1 -caseína de leite bovino. Essa caseína foi identificada a partir da adição de 2,5% (v/v) de leite de vaca com o método Ureia-PAGE. O autor verificou melhor separação das “bandas” com o método de ureia-PAGE, as diferenças entre os perfis das amostras analisadas podem ser visualizadas na figura 7A. A técnica de Ureia-PAGE se mostrou mais eficiente para esse tipo de fraude.

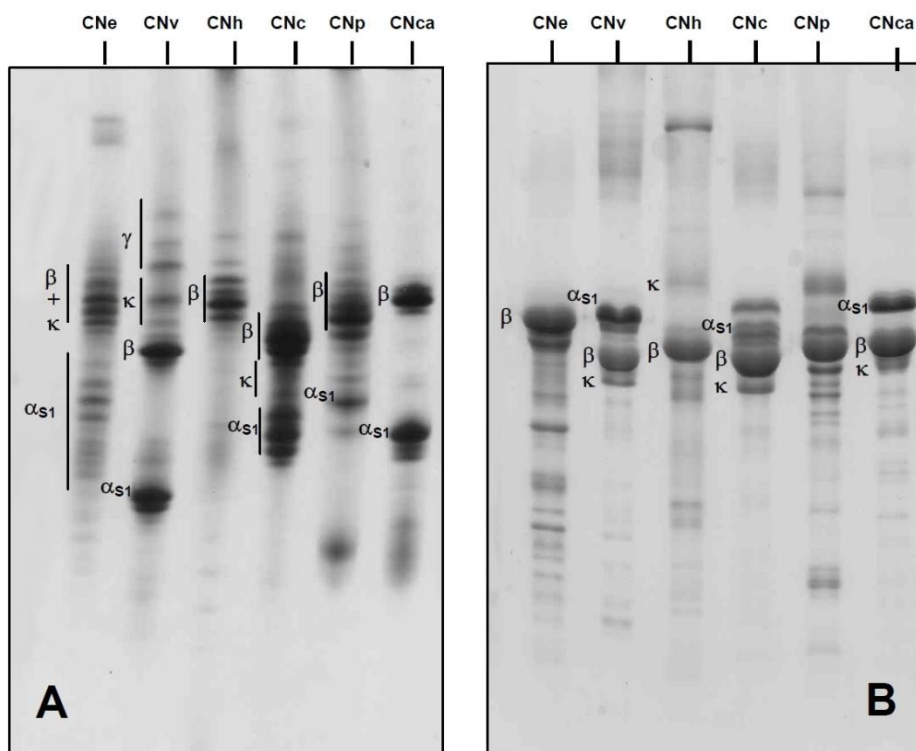


Figura 7. Comparação das caseínas de leite de diferentes espécies, através da eletroforese para a detecção de fraude de leite de cabra com adição do leite de vaca obtido pelos métodos UREA-PAGE (A) e SDS-PAGE (B).

As indicações ao lado das “bandas” se referem ao tipo de caseína (α_{S1} , β , κ ou γ). CNe - caseína de égua; CNv - caseína de vaca; CNh - caseína humana; CNc - caseína de cabra; CNp - caseína de porca; CNca - caseína de camela. Fonte: Egito *et al.*, 2006.

Pesic *et al.* (2011) analisaram a adulteração de leite bovino em caprinos e leites ovinos através da técnica NATIVE-PAGE. Os autores trabalharam com as proteínas do soro bovino β -lactoglobulina (β -LG) e α -lactoalbumina (α -LA) como identificador de fraude. A intensidade da banda referente à (β -LG) e (α -LA) do leite da vaca são observadas a partir da adição de 5% (v/v) de leite de vaca, como mostra o destaque da figura 8.

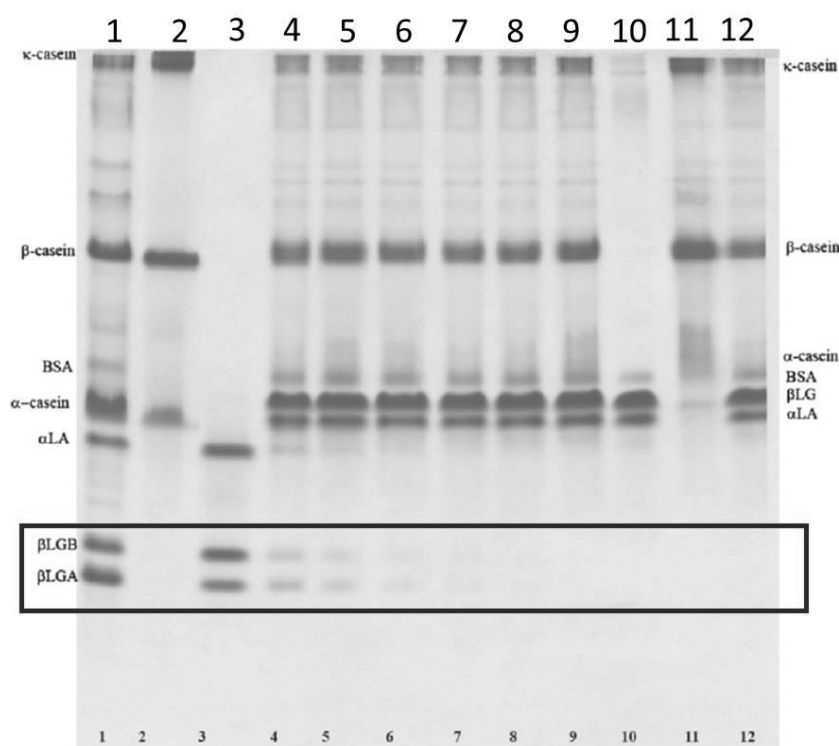


Figura 8. Detecção de fraude de leite de cabra com adição do leite de vaca empregando o método NATIVE-PAGE.

1 - leite de bovino; 2 - caseínas de leite bovino; 3 - proteínas de soro de bovino; 4 a 9 - adição de leite bovino em caprino de 20%, 10%, 5%, 3%, 2% e 1% (v/v), respectivamente; 10 - proteínas de soro de caprinos; 11 - caseínas de caprinos; 12 - leite de caprinos. Fonte (Pesic *et al.*, 2011)

3.6.5 Método de eletroforese de Focagem Isoelétrica

A técnica de eletroforese de focagem isoelétrica (IEF) apresenta fundamentos semelhantes aos da técnica de SDS/UREIA-PAGE, pois também necessita da preparação de gel de poliacrilamida em placas de vidro e necessita de aplicação de corrente elétrica (SANTOS, 2011). Porém para que ocorra a focalização isoelétrica é necessário primeiramente adicionar anfólitos (íons que se comportam como ácido e base ao mesmo tempo) no gel, aplica-se o campo elétrico de modo que os anfólitos migram em direção aos pólos negativos e positivos de acordo com sua carga elétrica e distribuem-se pelo gel, estabelecendo assim um gradiente de pH estável. As proteínas possuem uma carga nativa que pode ser positiva, negativa ou nula dependendo do pH do meio. As soluções de proteínas são inseridas no gel, aplica-se novamente o campo elétrico, então irão se mover em direção ao eletrodo com carga oposta. Durante a migração a proteína irá captar ou perder prótons, a sua

velocidade diminuirá até chegar ao ponto em que o valor de pH será igual ao seu ponto isoelétrico (pI), ocorrendo a neutralização das cargas das proteínas, as cargas se igualam, deixando de migrar e se posicionam em um ponto conhecido (MONTEIRO, 2004). Como comentado no tópico 3.5, a legislação da União Europeia utiliza a técnica de focagem isoelétrica juntamente com ureia. Utiliza-se as caseínas γ_3 e γ_2 para detecção da presença de leite bovino em queijo caprino e ovino. A avaliação das bandas coradas de γ_3 -caseína e de γ_2 -caseína é feita por comparação entre as bandas das amostras e as bandas dos padrões de referência com 0 e 1 % de leite de vaca (UNIÃO EUROPEIA, 2008).

3.6.6 Método de eletroforese microfluídica “Lab-on-a-chip” (Agilent 2100 Bioanalyzer)

A metodologia de eletroforese em microchip da tecnologia Agilent 2100 Bioanalyzer se apoia na justificativa de otimização das análises comparada às outras técnicas de eletroforese. A tecnologia “Lab-on-a-chip” é recomendada para a quantificação e controle de qualidade de DNA, RNA e proteínas. A fundamentação das reações empregadas na técnica não são totalmente divulgadas pela empresa, mas a eletroforese microfluídica de proteína é um modelo reduzido da versão SDS-PAGE, porque envolve as mesmas etapas da eletroforese convencional, tal como a preparação do gel, o carregamento da amostra, a separação eletroforética, coloração, descoloração e detecção, porém acontecem dentro de um *chip*. Os reagentes são disponibilizados em kits. Além da vantagem da agilidade nas análises laboratoriais, o método “Lab-on-a-chip” não exige a exposição constante a reagentes tóxicos comumente utilizados nos métodos convencionais, a análise dos dados é automatizada, o que permite a obtenção rápida de resultado e disponibilizam informações qualitativas, quantitativas individuais dos fragmentos de interesse (NITSCHKE, 2011; ANEMA, 2009).

Assim como o DNA e RNA, as proteínas estão sendo usadas em diversas pesquisas com o emprego da técnica “Lab-on-a-chip”. Anema (2009) testou a metodologia para separação de proteínas de leite bovino desnatado. O autor obteve separação satisfatória para as proteínas avaliadas α_{S1} -caseína (α_{S1} -CN), α_{S2} -caseína (α_{S2} -CN); β -caseína (β -CN), κ -caseína (κ -CN), β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbumina (α -LA), albumina de soro bovino (BSA), lactoferrina (LF) e

imunoglobulina G (IgG). As proteínas α -LA, β -LG, IgG, BSA e LF obtiveram picos de maior resolução. Os picos formados a partir dos fragmentos proteicos, gerados da corrida eletroforética, são demonstrados na figura 9.

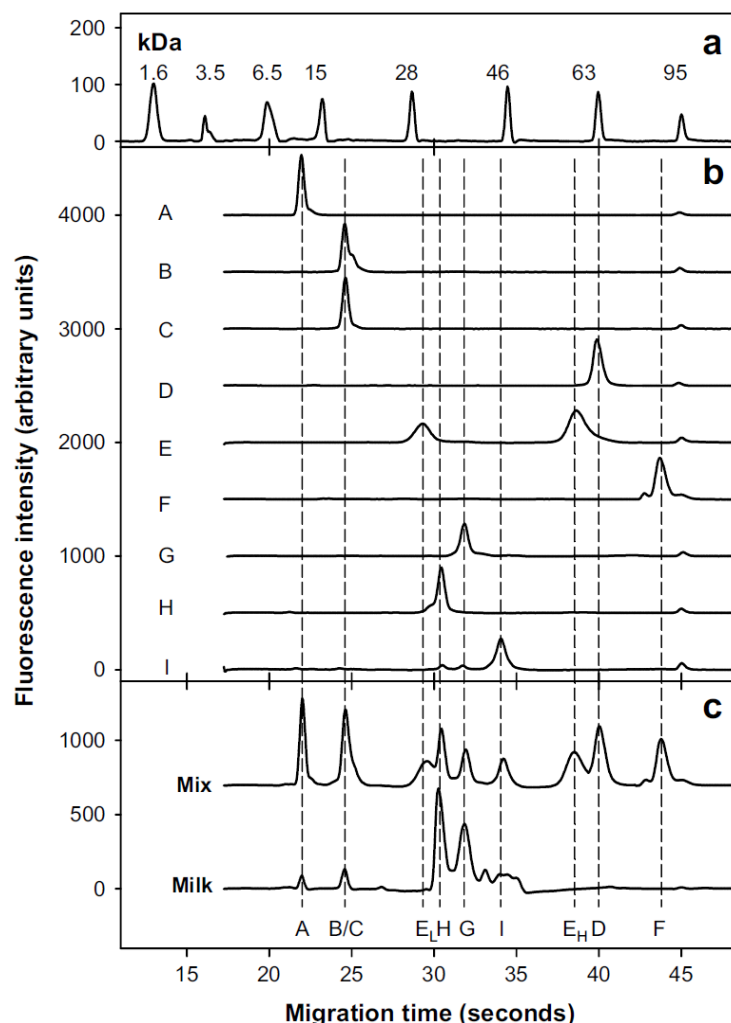


Figura 9. Separação de proteínas do leite pelo método de eletroforese microfluídica com a tecnologia “Lab-on-a-chip”.

(a) o padrão de migração para proteínas com escala de peso molecular. Os números acima dos picos correspondem aos pesos moleculares das proteínas. A fração (b) corresponde ao padrão de migração para várias proteínas do leite individuais. A = α -LA; B = β -LG (variante A); C= β -LG (variante B); D=BSA; E=IgG (EL: cadeia leve; EH: cadeia pesada); F=LF; G= α S₁-CN; H= β -CN; I= κ -CN. A fração (c) mostra o padrão de migração para uma amostra mista de proteína do leite e amostra de leite fresco desnatado. Fonte: Anema, 2009

O peso molecular dos fragmentos das proteínas apresentadas pela metodologia “Lab-on-a-chip” difere dos valores obtidos pelo método SDS-PAGE, como demonstrado na TABELA 5 (ANEMA, 2009).

TABELA 5. Comparação do peso molecular das proteínas do leite entre as técnicas SDS-PAGE e “Lab-on-a-chip”.

Proteína	Peso molecular estimado - Microchip (kDa)	Peso molecular estimado - SDS (kDa)	Peso molecular estimado - SDS * (kDa)
αS1-CN	33	30	23,6
αS2-CN	38	35	23,5
β-CN	29	27	24
κ-CN	42	24	19
β-LG	18	19	18,3
α-LA	12	13	14,1
BSA	63	69	----
LF	87	89	----
IgG_{leve}	26	24	----
IgG_{pesada}	54	57	----

Adaptado: Anema, 2009 e Farrell* *et al.*, 2004.

Apesar da grande sensibilidade dos métodos eletroforéticos em gel de poliacrilamida, há grande dificuldade da sua aplicação em um laboratório de rotina, em razão do tempo necessário para a preparação das amostras, separação física das partículas, da quantificação individual das proteínas de cada amostra. Para a técnica de SDS-PAGE utiliza-se muitas horas até dias para a preparação de amostras e gel, a corrida eletroforética no gel, coloração e descoloração, sem contar o tempo gasto na adequação dos resultados em software para a análise dos dados. No entanto com a técnica do “Lab-on-a-chip”, dentro de 30 minutos após o início da eletroforese microfluídica, é possível obter automaticamente resultados tanto no formato de gel quanto em forma de gráficos, contendo massa molecular, tempo de corrida, concentração das proteínas e quantificação individual das proteínas de cada amostra, cada *chip* possui 10 poços destinados a amostras. A metodologia da tecnologia Bioanalyzer possibilita a visualização simultânea da corrida eletroforética. Além disso, as técnicas convencionais também demandam altos volumes de materiais, dos quais muitos são tóxicos. A técnica de SDS-PAGE requer a utilização de soluções acrilamida, *buffers* (solução tampão) em grandes volumes e coloração e descoloração de soluções que contêm álcoois e ácidos (ANDREWS, 1983 e CREAMER, 1991 *apud* ANEMA, 2009). Enquanto o microchip exige quantidades muito pequenas de materiais e amostras, demandando menos que 0,5 ml de volume total por *chip* como mostra o QUADRO 1.

QUADRO 1. Comparação de algumas técnicas utilizadas na detecção de fraude de leite caprino com adição de leite bovino.

Métodos	Tecnologia utilizada	Vantagens	Desvantagens
HPLC	Cromatografia	. alta sensibilidade . alta reprodutibilidade	. necessita de análise dos dados . trabalhoso
PCR	Amplificação de DNA	. alta sensibilidade . alta reprodutibilidade tem opção de análise dos dados automatizada	. Extração DNA . Mais trabalhoso que “Lab-on-a-chip”
SDS/UREIA/ NATIVE-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida	. alta sensibilidade . alta reprodutibilidade	. gasto de altos volumes de reagentes . exposição a produtos tóxicos . necessita de análise dos dados . trabalhoso.
Focalização Isoelétrica	Eletroforese em gel de poliacrilamida	. alta sensibilidade . alta reprodutibilidade	. gasto de altos volumes de reagentes . exposição a produtos tóxicos . necessita de análise dos dados . trabalhoso.
“Lab-on-a-chip”	Eletroforese em <i>chip</i>	. uso muito pequeno de reagentes . rápido processo de preparação dos materiais . análise dos dados automática, . alta reprodutibilidade	. Sensibilidade baixa para análise de proteína

FONTE: O autor, 2013

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO E LEITE BOVINO

As duas amostras de leite de cabras da raça Saanen, foram provenientes de propriedades de caprinocultura leiteira no município de Coronel Pacheco - MG, próximos à cidade de Juiz de Fora - MG. As duas amostras de tanque de leite de vaca da raça Holandesa foram adquiridas no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco (MG). As amostras foram transportadas em frascos de plástico e conservadas no gelo, logo após a chegada ao laboratório foram armazenadas em temperatura de - 80°C até o momento da análise. As determinações analíticas foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite situado na cidade de Juiz de Fora-MG.

4.2 PREPARAÇÃO DAS PROPORÇÕES DE MISTURA DE LEITE DE CABRA E VACA

As amostras foram preparadas com diferentes proporções de mistura de leite caprino com leite bovino. As simulações de fraudes foram preparadas nas seguintes proporções crescentes de adição de leite de vaca em leite de cabra: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 50, 100% (v/v). Sendo o leite de cabra puro (0%) e leite de vaca puro (100%). Para a detecção de adulteração de leite caprino com adição de leite bovino as proteínas totais das amostras de leite foram quantificadas pelo método de Bradford utilizando o *kit* Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA, EUA), no espectrofotômetro “Protein Bradford” (NanoDrop® ND-1000 Technologies, Wilmington, Delaware, EUA) e o perfil eletroforético das proteínas foi analisado pelo método “Lab-on-a-chip” (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). As amostras foram preparadas com diferentes proporções de mistura de leite caprino com leite bovino.

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

A quantificação das proteínas foi realizada através do método de Bradford utilizando o *kit* Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA, EUA). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro no módulo “Protein Bradford”. Para a preparação da curva de calibração foi utilizado como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a qual foi diluída em água ultrapura. As concentrações de BSA utilizadas foram 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 mg/ml. Pipetou-se 4 µL de cada uma das concentrações da proteína padrão em microtubos de 0,6 ml e adicionou 200 µL do reagente Bradford previamente diluído em água ultrapura (1:5 v/v), em seguida foi misturado em um agitador de tubos tipo *vórtex*. Depois de 5 minutos, foram realizadas as medidas de absorbâncias das proteínas em quintuplicata a 595 nm no espectrofotômetro utilizando o módulo “Protein Bradford”. O “branco” solicitado pela metodologia foi o reagente Bradford.

As misturas de leite de cabra e de vaca preparadas em diferentes proporções foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:25 (v/v). Posteriormente também foram misturadas com o reagente Bradford, sendo 4 µL de amostra e 200 µL do corante já preparado e foram submetidas à leitura do espectrofotômetro. As diferentes concentrações da proteína padrão (BSA) fornecidas pelo espectrofotômetro, foram aplicadas ao programa Excel para elaborar a curva de calibração e calcular o coeficiente de correlação (R^2).

4.4 PREPARO DO TAMPÃO DE SEPARAÇÃO DE PROTEÍNA (SEP)

A solução de tampão SEP foi preparada com 6 M Ureia, 0,02 M citrato de sódio, 0,1 M de ácido cítrico e hidroximetilpropilcelulose a 0,05%.

4.5 EXTRAÇÃO DAS CASEÍNAS

Realizou-se a extração de caseínas das amostras das misturas dos leites caprino e bovino, com o intuito de concentrar as caseínas para melhorar a sensibilidade do método e evidenciar a α -caseína do leite bovino no leite caprino e κ -caseína do leite caprino. O volume de 30 mL de cada amostra de leite com as misturas de leite de cabra e de vaca nas proporções 2, 4, 6, 8, 10, 20 e 50% (v/v), incluindo uma amostra de leite caprino puro e outra de leite bovino puro, foram centrifugadas a 4.000 x g por 30 min, a 30°C. A gordura na superfície do tubo foi retirada com uma espátula. Foi adicionado HCl a 1 M em cada amostra até alcançar pH 4,6, atingindo a precipitação isoelétrica (obs: pH do leite é em torno 6,6). As amostras foram centrifugadas novamente a 1500 x g por 20 min a 32°C para separar o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante (lactosoro) foi retirado. O precipitado foi lavado com 30 mL de água destilada e misturado através do agitador de tubos tipo vórtex até dissolver o pellet. Foi realizada a centrifugação a 1500 x g por 20 min a 20°C. O processo de lavagem, de mistura e a última centrifugação foram repetidos por 2 vezes. Cada amostra contendo a solução de caseína precipitada foi preparada com 26mg/mL no tampão bis-tris propano para resuspender as caseínas.

4.6 MÉTODO "LAB-ON-A-CHIP"

A detecção de adulteração do leite foi obtida através das análises eletroforéticas das proteínas do leite. As amostras de leite utilizadas foram as mesmas quantificadas previamente pelo método de Bradford, as quais foram preparadas amostras da mistura de leite de cabra e de vaca, adicionando leite de vaca nas seguintes proporções: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 50% (v/v), incluindo uma amostra de leite caprino puro, uma de leite bovino puro e outra com mistura das caseínas de leite de vaca isoladas, sendo a αS_1 , β e κ , chamada de mix de caseínas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), estas amostras foram diluídas em um tampão de separação de proteínas (tampão SEP) na proporção 1:5. Avaliou-se um segundo grupo dos mesmos exemplares da proporção 1:5, no qual foi feita a diluição das amostras em tampão SEP na proporção 1:25, com o intuito de converter a concentração das amostras para 3000 ng/ μ l, ajustando-as à faixa qualitativa do

método “Lab-on-a-chip” (6 a 4.000 ng/ μ l) indicada pelo fabricante. A técnica utilizada para as análises foi a eletroforese microfluídica em *chip* do sistema Agilente 2100 Bionalyzer aliado aos reagentes do kit Protein 80 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). O kit contém um protocolo para execução dos procedimentos, reagentes, incluindo a solução de gel matriz, a solução de corante, um marcador de peso molecular de proteína de 5 a 80 kDa, chamado de *Ladder*, uma solução tampão com marcador de proteína o *Protein 80 sample buffer*, *chip* específico para proteína, seringa acoplada ao equipamento *chip priming station*, tubos coletores, coluna com filtro e *chip* de limpeza o *electrode cleaner*, é um *chip* transparente contendo as mesmas disposições de poços do *chip* de eletroforese, sendo manuseado conforme instrução do fabricante. Também foram necessários materiais, como pipetas e ponteiros de 10, 20, 100 e 1000 μ L, tubos de microcentrífuga de 0,5 ml, água ultrapura, solução 1M de ditioneitol (DTT), microcentrífuga, equipamento de aquecimento para a desnaturação das proteínas das amostras e agitador de tubos tipo vortex. Os tópicos 4.6.1 a 4.6.5 a seguir descrevem a preparação das soluções e procedimentos do método “Lab-on-a-chip” para cada *chip*.

4.6.1 Preparo do Gel-Dye Mix (G)

A solução de gel matriz e a solução corante foram retiradas da temperatura de origem (4°C) e deixadas à temperatura ambiente por 30 min e protegidas da luz. O gel foi misturado no agitador de tubo por 10 s, em seguida foi centrifugado em minicentrífuga por 10 s. Desse tubo com gel foram transferidos 650 μ l para um tubo com filtro, fornecidos pelo kit, centrifugou-se a 2.500 x g por 15 min, o filtro foi descartado. Posteriormente 25 μ l da solução corante foram adicionados no tubo de solução de gel, sendo misturados através do agitador de tubos. O Gel-Dye Mix preparado foi armazenado a 4°C até o momento da reação de eletroforese. O restante do corante foi armazenado a 4°C novamente protegido da luz.

4.6.2 Preparo da solução descolorante

A solução descolorante (DS) foi preparada com a transferência de 650 µl do gel matriz para um filtro (fornecido no kit), esse gel foi centrifugado para um tubo coletor em 2.500 x g por 15 min. O tubo coletor foi rotulado com a data em que a solução de descoloração foi preparada. O DS foi armazenado a 4°C e protegido da luz até o momento da preparação do *chip*.

4.6.3 Preparo da solução de desnaturação

A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada sob condição redutora, com solução 1 M de DTT. Para evitar ciclos de descongelamento/congelamento da solução *Protein 80 sample buffer* mantida a -20°C foi aliquoteado 40 µL dessa solução e deixada à temperatura ambiente por 10 min. A solução *Protein 80 sample buffer* foi misturada no agitador de tubos por 10 s e centrifugada em minicentrífuga por 15 s. Foi adicionado 1,4 µL de DTT aos 40 µL da solução *Protein 80 sample buffer*, a nova solução foi misturada no agitador de tubos por 5 s e centrifugada em minicentrífuga por 15 s e armazenada a 4°C até o momento da preparação do *chip*.

4.6.4 Preparo das amostras e marcador de peso molecular

Pipetou-se 4 µL de cada amostra de leite e 2 µL da solução de desnaturação em tubos de 0,5 ml, em seguida foram misturadas no agitador de tubos e centrifugadas em minicentrífuga por 15 s. Em outro tubo de 0,5 mL foi aplicado 6 µL do *Ladder*. As amostras e o *Ladder* foram desnaturados por 5 min a 95-100°C no equipamento termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) e em seguida foram colocadas em banho no gelo por 10 s e centrifugados em minicentrífuga por 15 s. Posteriormente, foram adicionados 84 µL de água ultrapura aos tubos com amostras e ao tubo com *Ladder* e misturados no agitador de tubos.

4.6.5 Preparo do microchip com os reagentes e as amostras

A aplicação dos reagentes e das amostras no microchip é orientada pelo esquema representado na figura 10 indicando os poços para a distribuição dos reagentes e das amostras. Os poços identificados como G1 a G4 foram carregados com 12 μ l de gel / corante matriz. O G1 foi utilizado para aplicação de pressão de ar fornecido pelo equipamento *Chip Priming Station* através de uma seringa, auxiliando a distribuição do gel / corante pelos canais dentro do *chip*. O DS é carregado com 12 μ l de solução de descolorante. Nas cavidades marcadas de S1 a S10, foram adicionadas 6 μ l de cada amostra de leite, cada *chip* tem capacidade para 10 amostras. O poço L é destinado ao padrão de peso molecular, nele foram adicionados 6 μ l da solução *Ladder*.

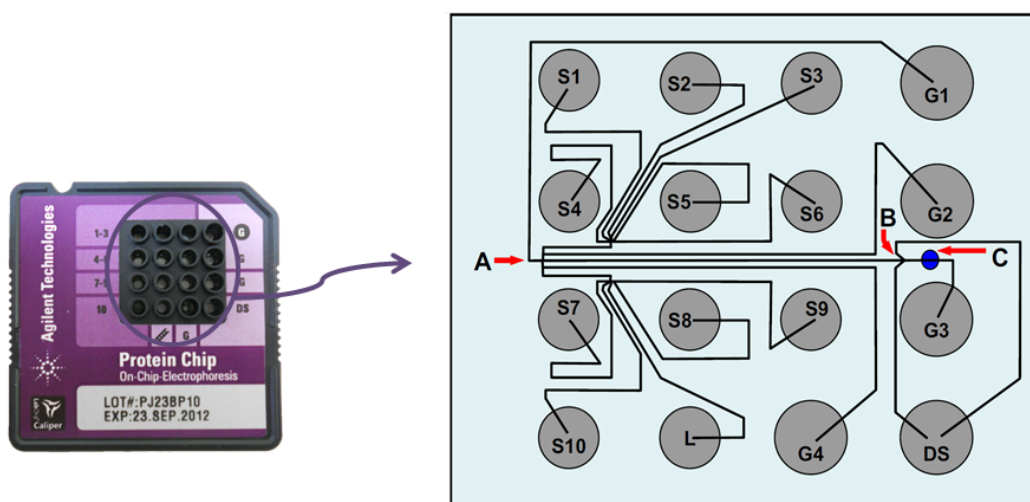


Figura 10. Representação dos poços e canais de um *chip* da tecnologia “Lab-on-a-chip” para análise de proteína.

G1 a G4 - gel / corante matriz; DS - solução de descolorante; S1 a S10 – amostras de leite; L – Ladder. As setas destacadas indicam: (A) - canal de separação, (B) - posição de descoloração e (C) - posição da janela de detecção.

FONTE: Adaptada: Anema, 2009.

O *chip* foi colocado no aparelho (Agilent 2100 Bioanalyzer) em um cartucho do aparelho específico para proteína, em seguida a tampa foi fechada. Com o fechamento houve o encaixe dos eletrodos aos respectivos poços do *chip*. Através do software (2100 Expert Software) as amostras foram nomeadas e o início da eletroforese foi acionado. O processo eletroforético e a leitura das informações

produzidas levaram cerca de 30 min. A migração das proteínas no gel foi observada através do peso molecular e área dos picos disponíveis no formato de gel e/ou de gráfico. Essas informações foram geradas a partir da fluorescência das proteínas e do marcador de peso molecular. Os picos produzidos pela corrida eletroforética foram gerados automaticamente, através do software. Ao final das análises, o *chip* foi removido e descartado, uma vez que não pode ser reutilizado. Os eletrodos foram higienizados pelo sistema *electrode cleaner*.

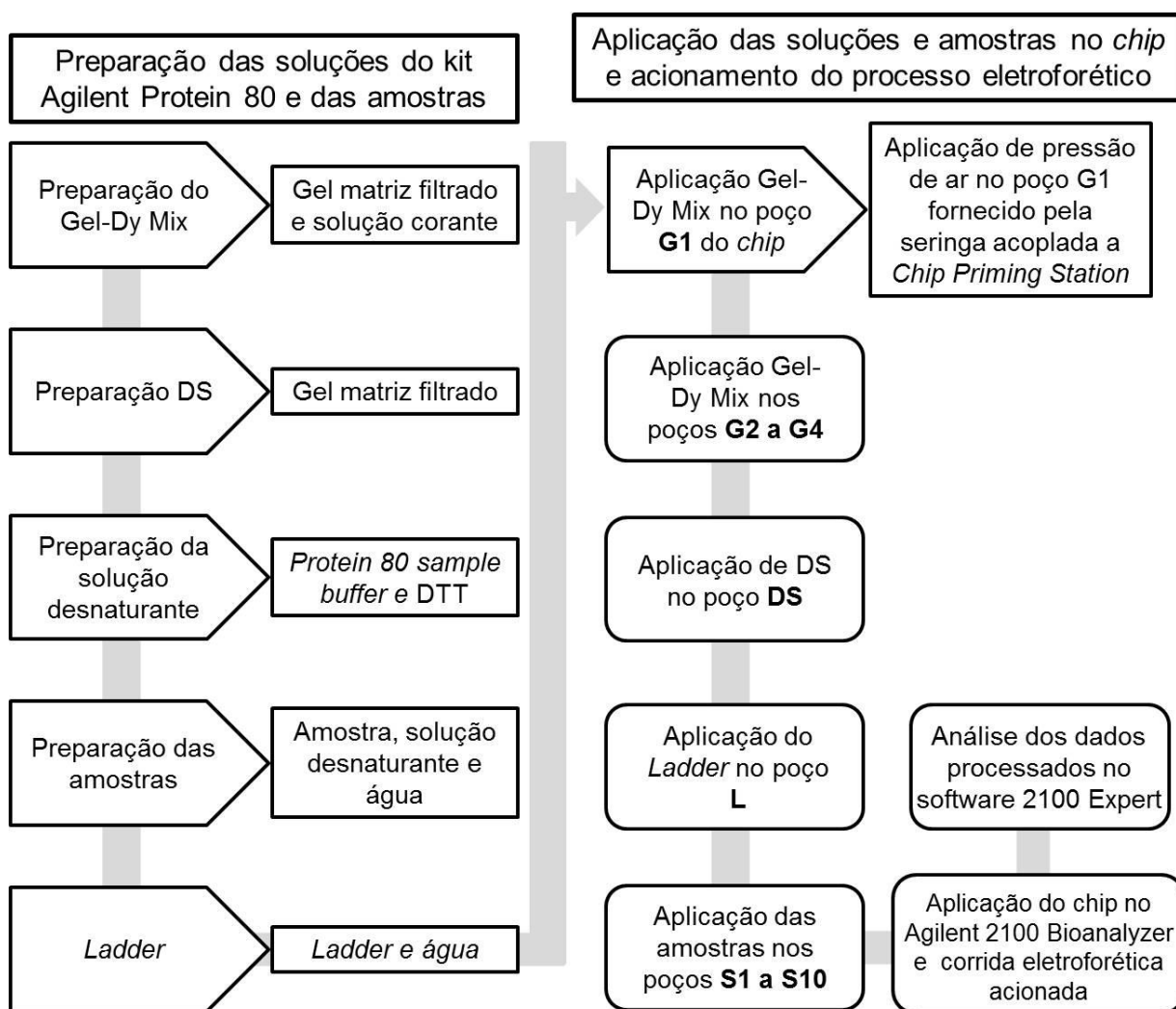


Figura 11. Fluxograma do preparo das soluções do kit Agilent Protein 80, das amostras e as análises dos dados.

FONTE: O autor, 2013

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

As absorbâncias da proteína padrão BSA obtidas por determinação espectrofotométrica foram correlacionadas com suas crescentes concentrações previamente preparadas, resultando em uma curva analítica de calibração, a qual gerou uma equação de regressão linear: $y=0,0481x+0,0044$ com coeficiente de correlação maior que 0,98, de acordo com a figura 12, mostrando a linearidade do método para estimar a quantidade de proteína das amostras de estudo.

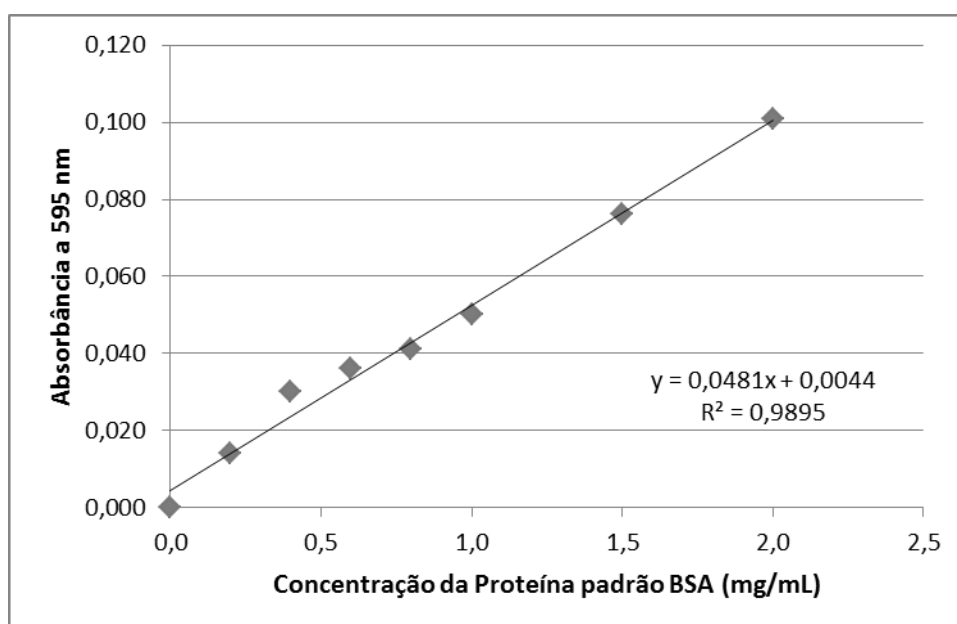


Figura 12. Curva de calibração da proteína padrão BSA obtida pelo método de Bradford. FONTE: O autor, 2013

A média das concentrações quantificadas das proteínas totais das amostras, obtidas no espectrofotômetro pelo método de Bradford e estimadas através da equação de regressão linear com coeficiente de correlação linear acima de 0,98 geradas pela curva padrão da proteína BSA e pela absorbância das amostras fornecidas no espectrofotômetro são apresentadas na TABELA 6, na qual se pode observar a proximidade dos valores das concentrações resultantes de ambas. As concentrações das amostras foram corrigidas pelo fator de diluição em que as amostras foram submetidas (1:25). Os valores quantificados foram utilizados para

nortear os cálculos de diluição das amostras para ajustar à faixa qualitativa do método “Lab-on-a-chip” (6 a 4.000 ng/ μ l).

TABELA 6. Quantificação das proteínas totais das amostras leite de cabra adulterado com leite de vaca por espectrofotometria pelo método de Bradford.

Amostras de leite *	Proteínas totais quantificadas ^a	Proteínas totais estimadas ^b
	(g/L) (média \pm DP)	(g/L) (média \pm DP)
Leite Cru de Cabra	25,13 \pm 4,69	25,72 \pm 4,84
Leite de Cabra (2%)	26,27 \pm 3,92	26,20 \pm 4,10
Leite de Cabra (4%)	19,67 \pm 1,31	19,65 \pm 1,29
Leite de Cabra (6%)	18,37 \pm 2,20	18,19 \pm 2,19
Leite de Cabra (8%)	33,04 \pm 9,39	33,06 \pm 9,33
Leite de Cabra (10%)	30,85 \pm 1,75	30,87 \pm 1,70
Leite de Cabra (12%)	29,84 \pm 4,22	29,94 \pm 4,36
Leite de Cabra (15%)	21,66 \pm 2,40	21,52 \pm 2,48
Leite de Cabra (20%)	24,74 \pm 2,74	24,64 \pm 2,81
Leite de Cabra (50%)	23,19 \pm 2,42	23,18 \pm 2,55
Leite Cru de Vaca	26,78 \pm 2,17	26,82 \pm 2,27

* Indica diferentes proporções de leite de cabra:leite de vaca (v/v); DP – desvio padrão; a - Concentração fornecida pelo espectrofotômetro e b – Concentração calculada pela equação de regressão linear dada pela curva de calibração e pela absorbância das amostras fornecidas pelo espectrofotômetro.

FONTE: O autor, 2013.

5.2 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO “LAB-ON-A-CHIP”.

A TABELA 8 e as figuras 13, 14, 15 e 16 a seguir mostram os perfis eletroforéticos das caseínas do leite de cabra e vaca de amostras com caseínas purificadas e leite inteiro. As proteínas usadas para a investigação foram a α S₁-caseína e κ -caseína. A α S₁-caseína foi escolhida em razão da diferença de sua massa molecular no leite caprino em relação ao leite bovino. Já a escolha da κ -caseína se deve ao fato da eletroforese em *chip* captá-la somente no leite bovino, como pode ser observado na TABELA 8 e na figura 13. As outras caseínas e proteínas do soro das amostras das duas espécies são semelhantes nos perfis eletroforéticos no método “Lab-on-a-chip”, sendo a β -caseína a representante mais

evidente, a qual os picos referentes às amostras das duas espécies para essa caseína estão sobrepostos, como mostra os gráficos da figura 13. Os picos de proteínas detectadas pelo sistema são atribuídos automaticamente aos seus pesos moleculares. Os gráficos 13A e 13B são referentes às amostras diluídas em tampão na proporção 1:5 e 1:25, respectivamente. A figura 13 mostra que a κ -caseína do leite de vaca, é detectada nas amostras com menor diluição enquanto que nas amostras de maior diluição o pico não é evidente, como pode ser observado nas figuras 13A e 13B, apesar da segunda diluição se enquadrar na faixa de concentração das amostras indicada pelo protocolo de 6 a 4000 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Porém as concentrações das amostras da figura 13B são semelhantes entre si, consequentemente fornece representações gráficas mais fiéis aos resultados esperados.

O diferencial de migração das caseínas do leite de cabra e de vaca avaliadas na eletroforese microfluídica em *chip*, geraram pesos moleculares semelhantes para a β -caseína, entretanto esse parâmetro para a αS_1 -caseína difere entre os leites analisados, sendo que a massa molecular da αS_1 -caseína da vaca são menores que a da cabra. Pelas representações gráficas, verifica-se também que as concentrações da αS_1 -caseína da vaca nas amostras testadas são mais elevadas que a da cabra, corroborando com resultados dos autores Bevilacqua *et. al.*, (2001); Lara-Villoslada *et. al.*, (2004); Moraes, *et. al.*, (2010) e Woodford (2007), os quais discutem as hipóteses sobre a alergia ao leite de vaca, e o uso do leite de cabra como alternativa no seu tratamento. O método aponta somente κ -caseína do leite bovino, não identificando para o leite caprino, conforme demonstrado tanto pelo fabricante do método quanto por esse experimento, como mostra a TABELA 8 e os gráficos a seguir.

TABELA 7. Comparação das massas moleculares das caseínas em análise referente ao leite caprino e bovino, estimadas pelo método “Lab-on-a-chip”.

Caseínas do Leite	Massa Molecular Estimada (kDa)	
	Leite de Cabra	Leite de Vaca
β -caseína	33,2	33
αS_1 -caseína	40.4	37.7
κ -caseína	---	43.9

FONTE: O autor, 2013

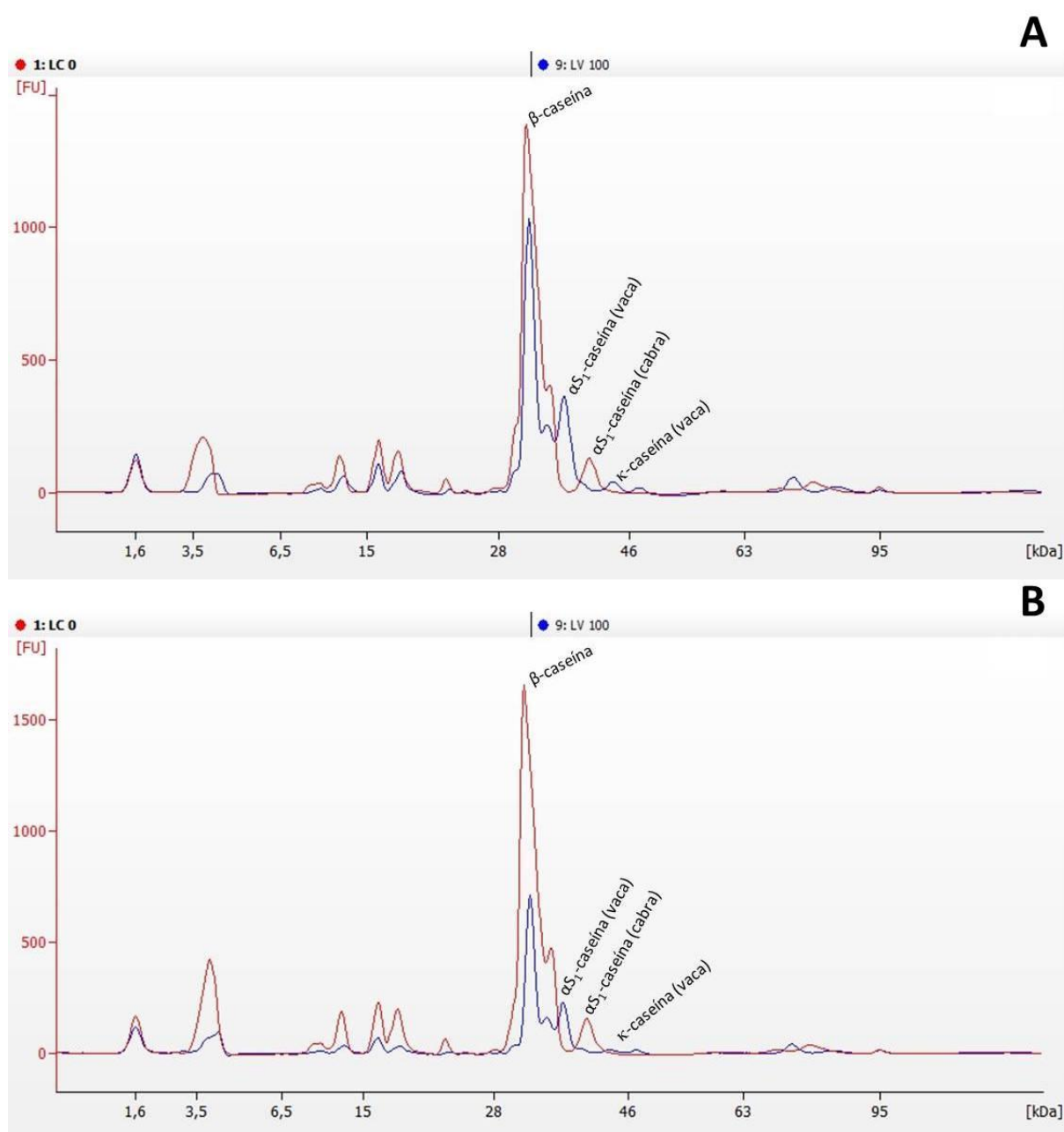


Figura 13. Perfil da corrida eletroforética de amostras de leite cru de cabra e leite cru de vaca, comparando as diferenças entre as amostras diluídas na proporção 1:5 (A) versus 1:25 (B).

LC 0: Leite de cabra puro; LV 100: Leite de vaca puro.

FONTE: O autor, 2013

A figura 14 ilustra as diferenças entre as amostras de caseínas purificadas representada pela letra (A), as amostras de leite diluídas na proporção 1:5 demonstradas pela letra (B) e na proporção 1:25 identificada por (C). A figura 14 compara as amostras de leite de cabra, leite de vaca e duas amostras com adição de leite bovino em leite caprino nas proporções de 20% e 50%, respectivamente. O pico da κ -caseína obtido das amostras de caseínas puras (figura 14A) são mais acentuados em relação ao pico das amostras de leite (14B e 14C). No entanto as figuras 14B e 14C apresentam uma melhor integridade dos picos.

Na avaliação dos resultados foi observado que a κ -caseína da vaca das amostras de caseínas puras da figura 14A, é detectada nos exemplares com adição de leite de vaca em leite de cabra com proporção de 20%, 50% e 100%. Entretanto a αS_1 -caseína bovina, identificada pela seta azul, é visualizada a partir de 20% tanto nas amostras de caseínas puras (figura 14A) quanto nas amostras diluídas nas proporções 1:5 e 1:25 figuras 14B e 14C, respectivamente.

A figura 15 ilustra a corrida eletroforética da amostra com 20% de adição de leite bovino no leite caprino comparada com a amostra de leite bovino puro, onde há o início do aparecimento do pico da αS_1 -caseína bovina, indicada pela seta azul.

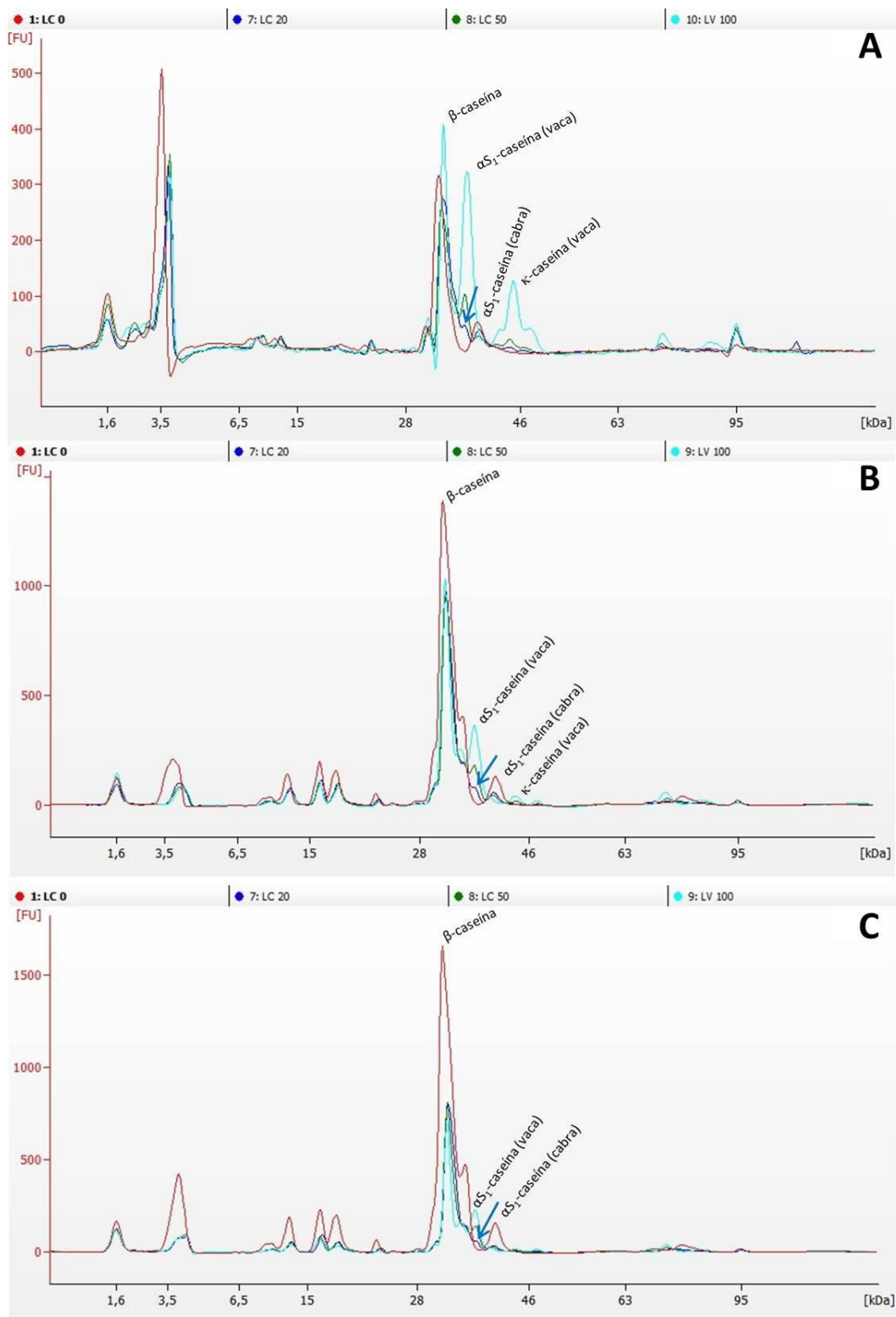


Figura 14. Perfil da corrida eletroforética de amostras de leite de cabra com adição de leite de vaca em proporções crescentes, comparando as diferenças entre as amostras com as caseínas purificadas (A) versus as amostras diluídas na proporção 1:5 (B) e 1:25 (C).

LC0: Leite de cabra puro; LC20, LC50: adição de leite bovino em leite caprino de 20% e 50% (v/v), respectivamente; LV 100: Leite de vaca puro.

FONTE: O autor, 2013

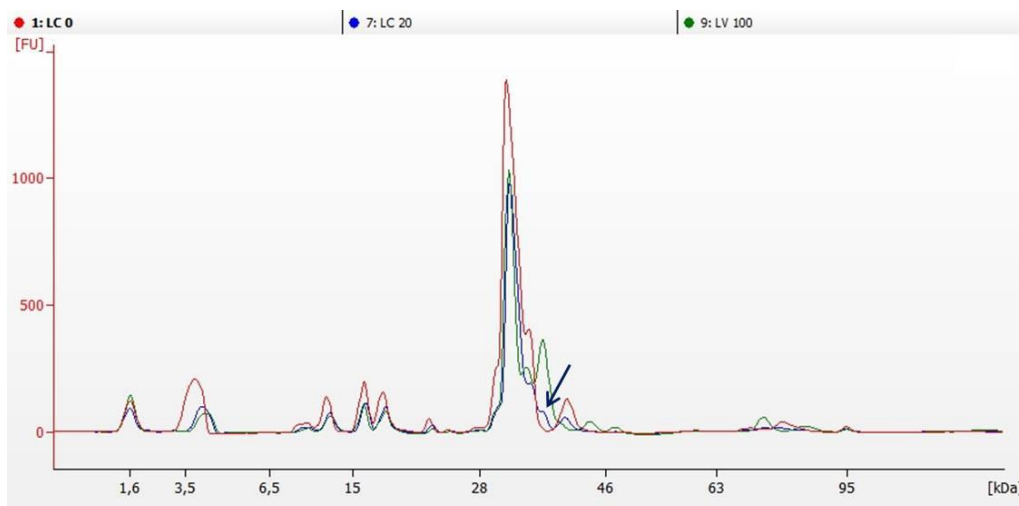


Figura 15. Perfil da corrida eletroforética da amostra com 20% de adição de leite bovino no leite caprino, comparada à amostra de leite bovino puro

LC 0: Leite de cabra puro; LC 20: adição de leite bovino em leite caprino de 20% (v/v); LC 100: Leite de vaca puro. FONTE: O autor, 2013

Além das representações gráficas o método de eletroforese microfluídica em *chip* gera a imagem de um gel virtual para visualização das proteínas analisadas no formato em que realmente ocorre a migração das macromoléculas. A figura 16 demonstra a posição final das caseínas αS_1 , β e κ durante a migração no gel. As caseínas de menor peso molecular migram mais rapidamente, por isso ficam dispostas abaixo das moléculas de maior peso molecular, considerando que a migração ocorre no sentido de cima para baixo da figura. O gel (A) representa as amostras com caseínas purificadas, o gel (B) contem as amostras diluídas em tampão na proporção 1:5 e o gel (C) contem as amostras diluídas em tampão na proporção 1:25. As bandas formadas pela β -caseína estão presentes em todas as amostras, em razão da semelhança de peso molecular entre as duas espécies analisadas. A κ -caseína aparece em todas as amostras de leite de vaca puro e no mix de caseínas (Mix CNs) do leite de vaca inseridas nas corridas dos géis (B) e (C), como esperado. No gel (A) e (B) a análise identifica a κ -caseína na amostra com 20% de fraude, porém a banda é visível a partir da amostra de 50%. No gel (C) a banda da amostra de 50% não é nítida. A αS_1 -caseína da vaca já é esperada nas amostras de leite de vaca no Mix de caseínas do leite de vaca. O software detecta a separação da αS_1 -caseína da vaca nas amostras com 20% (v/v) de fraude, mas também não são evidentes. Essa caseína começa a ser visível na amostra de 50% (v/v) de fraude nos três géis.

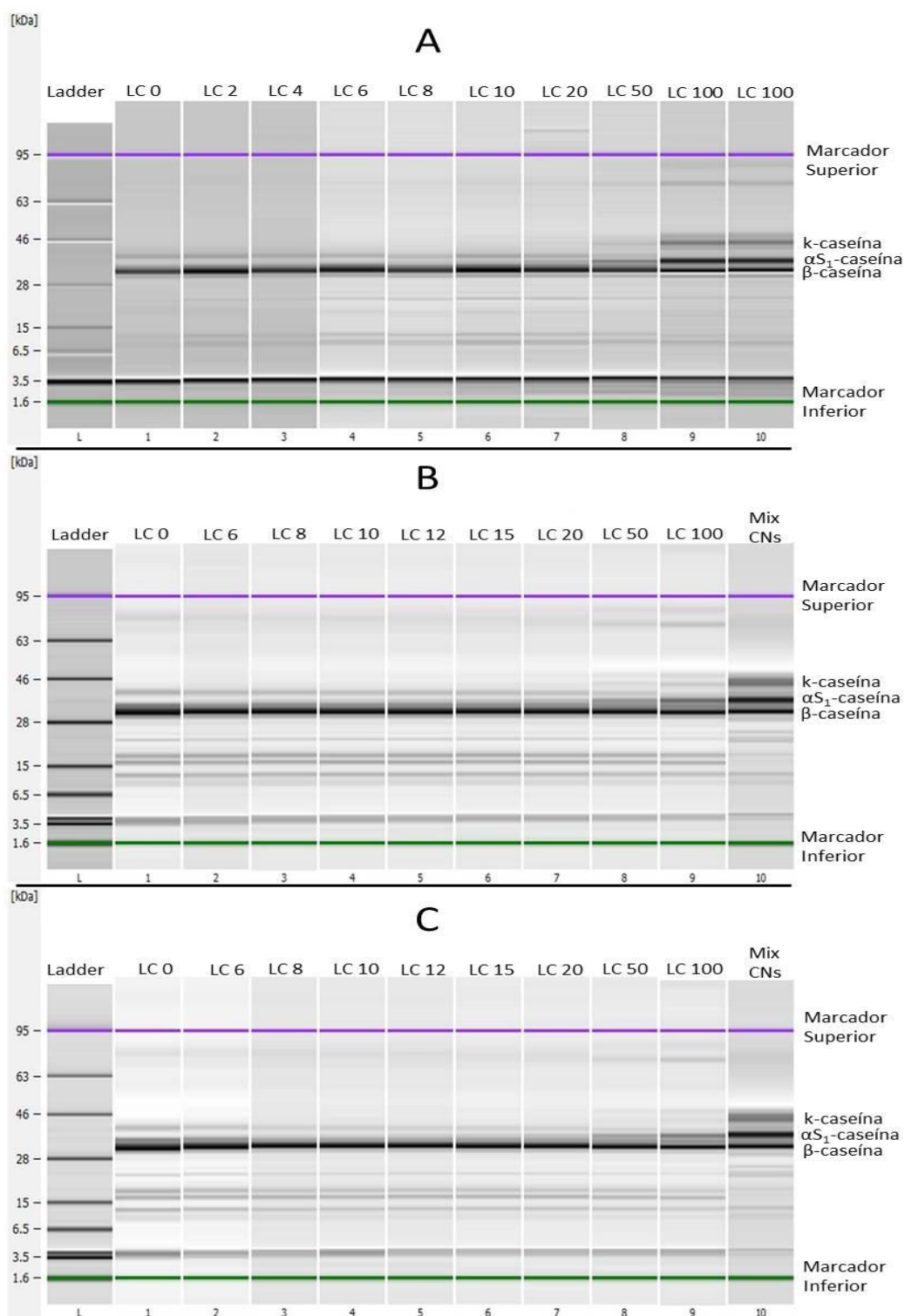


Figura 16. Perfil eletroforético das caseínas αS_1 , β e κ do leite de cabra e de vaca pela tecnologia “Lab-on-a-chip”.

(A): amostras com caseínas extraídas; (B): amostras diluídas em tampão na proporção de 1:5; (C): amostras diluídas em tampão na proporção de 1:25. LC0: Leite de cabra puro; LC2, LC4, LC6, LC8, LC10, LC12, LC15, LC20, LC50: adição de leite bovino em leite caprino de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 15%, 20% e 50% (v/v), respectivamente; LV 100: Leite de vaca puro.

FONTE: O autor, 2013

Anema (2009) testou o método para separação e quantificação das proteínas do leite bovino. Além do resultado positivo obtido, o autor confirmou as características informadas pelo fabricante de rapidez, alta reprodutibilidade e robustez. Na detecção de fraude de leite caprino com leite bovino, o método apresentou sensibilidade para a identificação de leite de vaca a partir de uma adição de 20%.

A quantidade do produto de fraude utilizado pelos fraudadores pode variar muito. Uma empresa pequena consegue obter lucro com esse tipo de fraude adicionando proporções elevadas do produto de fraude, já uma indústria com grande volume de produção consegue lucratividade com níveis pequenos de adulteração.

Um adequado sistema de identificação de adulteração com misturas de leite de diferentes espécies animais deve considerar a possibilidade de alguns fraudadores utilizarem o produto de fraude em proporções menores que o identificado pela técnica estudada nesse trabalho. Além disso, o sistema deve contar com características de rapidez, alta reprodutibilidade e robustez em análises de rotina. Resultados como os encontrados pelos autores Egito *et. al.* (2006), em que se verificou que a técnica Ureia-PAGE apresenta melhor separação das proteínas comparada à SDS-PAGE, mostram que a possibilidade de futuras mudanças no sistema estudado, incluindo outras variáveis pode aumentar a sensibilidade da técnica para aplicação em detecção de fraude com misturas de diferentes espécies.

6. CONCLUSÃO

Os métodos HPLC, PCR, SDS/UREIA/NATIVE-PAGE e Focalização Isoelétrica apresentaram maior sensibilidade na identificação de fraude em leite e seus derivados pela mistura de leite bovino e caprino em relação à técnica proposta nesse trabalho. Entretanto a característica de rápida disponibilização de resultados da tecnologia de eletroforese microfluídica em *chip* tem grande importância nas investigações de fraude de leite para laboratórios de rotina. Em razão da grande necessidade de um método eficiente na fiscalização desse tipo de fraude e a possível utilização do produto de fraude em volumes menores que o identificado pela técnica, o aperfeiçoamento com o intuito de aumentar a sensibilidade do método, traria grandes benefícios aos laticínios e aos consumidores de produtos lácteos, principalmente, quando se trata de qualidade de alimentos e saúde pública.

7. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O presente estágio foi realizado no Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora (MG) entre o período de 05 de Novembro de 2012 a 15 de Fevereiro de 2013, totalizando 460 horas de estágio. O principal objetivo do estágio foi desenvolver atividades referentes a ações dentro do projeto de “Desenvolvimento e Validação de Metodologias para Garantia da Qualidade, Segurança, Valor Nutricional e Detecção de Fraude em Leite e Produtos Lácteos”. Sendo que o tema escolhido do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) dentro desse projeto foi a de “Detecção de fraude em leite caprino com adição de leite bovino”, utilizando o método de eletroforese microfluídica através da tecnologia Agilent 2100 Bioanalyzer, para o qual foi realizada pesquisa bibliográfica, preparo de soluções, quantificação de proteínas totais utilizando o método de Bradford por espectrofotometria no aparelho NanoDrop ND-1000, e os respectivos tratamentos dos resultados.

Além das atividades relacionadas ao tema proposto, também foram exercidas atividades associadas a projetos em execução no Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa e participações em eventos.

Durante o estágio foi realizado o acompanhamento e auxílio na extração de DNA de sangue e extração de DNA de sêmen para o Banco de DNA de Bovino de Leite (BDBL). Também houve o acompanhamento de extração de RNA de glândula mamária de vacas para estudo da expressão gênica de resistência à mastite. Colaborou-se na produção de um resumo para o Congresso Higienistas de Alimentos, a ser realizado na cidade de Gramado (RS) em abril de 2013. Participou como colaboradora em resumo para o V Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite a ser realizado na cidade Águas de Lindóia (SP) em junho de 2013. Durante o mês de novembro houve a participação do “Workshop de Zootecnia de Precisão na Pecuária de Leite no Brasil”, ministrado nas dependências da Embrapa Gado de Leite, incluindo uma visita ao Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco/MG. No mês de dezembro houve a participação no curso de “Melhoramento Genético de Bovinos de leite” realizado nas dependências da Embrapa Gado de Leite e a participação de um treinamento do equipamento “Bioanalyzer eletroforese microfluídica” na Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF. Nesse mesmo mês houve acompanhamento na preparação dos materiais para uma corrida eletroforética com o método de eletroforese em UREA-PAGE. No mês de fevereiro de 2013 foi realizado acompanhamento das atividades do Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite.

Realizou-se uma visita ao Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Departamento de Física da UFJF no qual se trabalha na caracterização óptica de materiais usando as técnicas de absorção, luminescência, espectroscopia Raman, lente térmica, fotoacústica e capacidade térmica. Dentre outras pesquisas o LEM também trabalha com análise de produtos lácteos. Nesse laboratório tive a oportunidade de conhecer um aparelho portátil chamado Milk tech, de acordo com Nascimento *et al.* (2010) o aparelho é fundamentado na tecnologia de condutividade elétrica para a detecção de fraude em leite como adição de água e reconstituintes (cloreto de sódio, soda cáustica entre outros), liberando o resultado de adição de água em porcentagem. Esse equipamento é bastante promissor em razão da rapidez na disponibilização de resultado nas análises das amostras, fornecendo as informações em até 10 minutos, ainda no campo. O aparelho já foi patenteado e está prestes a ser lançado no mercado.

7.1 RELATÓRIO DE VISITA AO LABORATÓRIO DE QUALIDADE DO LEITE (LQL) DA EMBRAPA GADO DE LEITE

O Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) é credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para o Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Analisa a qualidade do leite cru produzido no Brasil. As análises realizadas incluem contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e outras análises como determinação do conteúdo de proteína, gordura, lactose, extrato seco desengordurado e sólidos totais. Para examinar a qualidade do leite o produtor deve estar previamente cadastrado no sistema do LQL. Os clientes recebem treinamento de como proceder na coleta das amostras de leite através de palestras ministradas por técnicos do LQL, também recebem um manual de coleta do leite. A cada requerimento de análise do leite do rebanho, o produtor precisa entrar em contato solicitando o material para a coleta do leite. O material enviado pelo LQL consiste em etiquetas com identificação do produtor e dois tipos de frascos contendo conservantes da amostra em forma de comprimido: um para análise de CBT, com o reagente azidiol e o outro para análise de CCS e componentes, inserido o reagente bronopol.

O equipamento utilizado para as análises de CBT é o Bentley Bactocount IBC, é um instrumento automatizado, utiliza a tecnologia de citometria de fluxo (FCM), quantifica bactérias individuais e unidades formadoras de colônias, através da marcação de DNA pelo corante brometo de etídio. Este equipamento pode analisar 150 amostras por hora. O aparelho possui dois sonicadores com função de eliminar células somáticas e separar colônias de bactérias. A cada amostra o aparelho suga um detergente para a limpeza dos canalículos de passagem das amostras, entre a troca de amostras para um rebanho diferente também é inserido o detergente para aumentar a eficiência de limpeza. A cada 60 amostras e entre a troca de amostras para um rebanho diferente é inserida uma amostra “piloto” para a calibração do equipamento. O valor da quantificação da amostra piloto deve coincidir com a média adquirida na calibração realizada no início de cada semana, com leite do rebanho do Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite de Coronel Pacheco/MG. As análises de CCS são realizadas pelo equipamento Somacount FCM (Citômetro de Fluxo) da Bentley Instruments® (Bentley Instruments Inc. Chasca, EUA) e acoplado ao Somacount FCM o Bentley FTS (Espectrômetro de Transformada de Fourier) analisa os componentes. Os aparelhos analisam a mesma

amostra, avaliando simultaneamente CCS e a composição do leite, incluindo teor de proteína, gordura, lactose, extrato seco desengordurado e sólidos totais. Após a homogeneização, uma parte do leite é removida da amostra e distribuída aos dois módulos de análise. Assim como no sistema de CBT a cada troca de rebanho é inserida uma amostra piloto para confirmação da calibração realizada com leite da unidade CEJHB.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento de técnicas de biotecnologia aplicada às áreas relacionada à produção animal pode aumentar a perspectiva do profissional de Zootecnia. Os métodos biotecnológicos vêm contribuindo cada vez mais para a evolução de pesquisas em diversas áreas de atuação do Zootecnista. Também vem possibilitando que o profissional a utilize como ferramenta para garantir a qualidade dos alimentos disponibilizados no mercado. Sendo útil tanto para os técnicos que atuam na produção de matéria prima e/ou seu processamento, quanto para quem atuar como agente fiscalizador.

Todos os esforços para estagiar na empresa Embrapa Gado de Leite foram recompensados pela grande experiência adquirida durante o período de trabalho. O conhecimento adquirido durante o estágio contribuirá para as futuras tomadas de decisões na minha vida profissional.

REFERÊNCIAS

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

ASSIS, R. A. **Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar com detector de ICPMS.** Tese de doutorado, Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 31, 2006.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES GAÚCHOS DE ZEBÚ. **Leite A2: Um novo mercado para o Gir Leiteiro** Disponível em: <(http://www.acgz.com.br/secao_zebu.php?pagina=2)>. Acesso em 11 novembro 2012.

BEER, M.; *et al.* **Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of native heat-denatured bovine β -lactoglobulin in ewes' and goats' milk cheese.** Z. Lebensm. Unters. Forsch, 203, p. 21–26, 1996.

BELANGER, J. **Criação de Cabras.** 4ª edição. Mem-Martins: Publicações Europa – América, Portugal, 1990.

BEVILACQUA, C. P. *et al.* **Goat's milk of defective α s1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β -lactoglobulin in guinea pigs.** J. Dairy Res. 68:217–227, United Kingdom, August, 2001.

Bioinformatics. Disponível em: <http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html>. Acesso em: 20/01/2013.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, 72, 248-254, Estados Unidos, 1976.

BRANDÃO, S. C. C. **Novas tecnologias para detecção de fraudes no leite.** Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV. Disponível em: <http://www.simleite.com/home/palestras/simleite6.pdf>. Acesso em: 15/12/2012.

BRASIL. Decreto nº 30.691 de 29 de março 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA.** Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/requisitos-sanitarios. Acesso em: 11/12/2012.

BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook.** Tetra Pak Processing Systems AB, Lund., cap. 2, p. 21-24, Suécia, 1995.

CAVALLI, S. V. *et al.* **Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers.** Journal: Food Chemistry - FOOD CHEM, vol. 106, n. 3, p. 997-1003, 2008.

COELHO, M. O. L. C. **Variabilidade das características do leite de cabra e sua influência no fabrico de queijo.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2012.

EGITO, A.S. *et al.* **Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.5, p.932-939, 2006.

FALEIRO, F. G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Embrapa Cerrados, 102 p. Planaltina-DF, 2007.

FAOSTAT. **Base estatística da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO).** Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 22/02/2013.

FARRELL, JR. H. M. *et al.* **Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision.** J. Dairy Sci. 87:1641–1674, 2004.

FERREIRA, I M.P.L.V.O.; CAÇOTE, H. **Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins.** Journal of Chromatography A, 1015 111–118, 2003.

FONSECA, M. V.; OLIVEIRA C. A. **A busca pela viabilidade na caprinocultura leiteira.** 2011. Disponível em : <<http://www.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/a-busca-pela-viabilidade-na-caprinocultura-leiteira-73608n.aspx>>. Acesso em: 18/02/2013.

FURTADO, M. **Fabricação de queijos de cabra.** São Paulo: Nobel S.A, 6ª ed., 1985.

GREPPI. G. F., RONCADA P.; FORTIN R. **Protein Components of Goat's Milk.** Disponível em: <http://bionanotech.uniss.it/wp-content/uploads/2011/09/15-Roncada-Greppi.pdf>. Acesso em: 26/11/2012.

GROVEZ, W. F., DAVIES, J. F. C., SELLS, B. H. **Spectrofotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference.** Analytical Biochemistry, 22, 195-210, 1968.

GRZESIAK, T. **O leite de cabra, leite do futuro para as crianças.** In: INTERESSES NUTRITIVOS E DIETÉTICOS DO LEITE DE CABRA. Niort. Anais... Paris: INRA, 1997, p. 22-37, 1997

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. **Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture.** Journal of the Society of Dairy Technology, v. 45, p. 94-104, 1992.

HELRICH, K. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.** Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists Inc., 1990.

JACOPINI, L. A. *et al.* **Leite de Cabra: Características e Qualidades.** Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica - ISSN 1982-422X , Vol. 6, nº1, jan-jun. 2011

KAMIZAKE, N. K.K. *et al.* **Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods.** Journal of Food Composition and Analysis 16, 507–516, 2003.

LARA-VILLOSLADA, F. *et al.* **Goat milk is less allergenic than cow milk in a murine model of milk atopy.** J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 39:354–360, 2004.

LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; XAUS, J. **The Balance Between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk Determines its Allergenicity.** Journal of Dairy Science Vol. 88, No. 5, p. 1654-1660, 2005.

MAGALHÃES M. A. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e Pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa - MG, 2008.

MONTEIRO, C. *et al.*, 2004. **Técnicas de Análise de Proteínas.** Disponível em: <medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2004/tecnicasanaliseproteinas.doc>. Acesso em: 14/03/2013.

MORAES, E. F. *et al.* **Polimorfismo genético da αS_1 -caseína em cabras do semiárido do Nordeste brasileiro.** Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 11, n. 3, p. 695-699, jul./set. 2010.

NASCIMENTO, W. W. G. *et al.* **Uso de medidas de condutividade elétrica para a detecção de adição de água, cloreto de sódio e soda cáustica no leite.** Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes, Jul/Ago, nº 375, 65, 11:17. 2010.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. **Métodos de separação e identificação de princípios ativos naturais.** V Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, Itajaí, out, 2010.

NITSCHKE, R. **Milk protein analysis with the Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent Protein 80 kit.** Publication Number 5990-8125EN. Published in USA, 2011.

PARDO, M. F.; NATALUCCI, C. L. Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. **Acta Farm Bonaerense**, La Plata, Argentina, n. 21, p. 57-60, 2002.

PEREZ, M.D.; CALVO, M. **Interaction of b-lactoglobulin with retinol and fattyacids and its role as a possible biological function for this protein, a review.** Journal of Dairy Science 78, 978–988, 1995.

PESIC, M. *et al.* **Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE.** Food Chemistry, Belgrade, n.125, p 1443–1449, 2011.

PLATH, A.; KRAUSE, I.; EINSPANIER, R. **Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques.** Z Lebensm Unters. Forsch 1997, 205, 437-441.

REGITANO, L. C. A. *et al.* **Biologia Molecular aplicada à Produção Animal.** Embrapa Informação Tecnológica, 215 p. Brasília, 2001.

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

ROCHA, T. L.; *et al.* **Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Comunicado Técnico da Embrapa nº 136. Brasília – DF. Outubro, 2005.

RODRIGUES N. P. A. *et al.* **Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay**. Journal of Dairy Science Vol. 95 N°. 5, 2012.

SANTOS, L. R., 2011. **Eletroforese**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/bioquimica/eletroforese/>>. Acesso em: 13/03/2013.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 517 p., p.139-157, 1996.

SGARBIERI, V.C. **Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite**. Braz. J. Food Technol., v.8, n.1, p. 43-56, Campinas-SP. jan./mar., 2005.

SILVA, A. A. *et al.* **Estudo do polimorfismo genético da αS_1 -caseína em cabras, no estado de Pernambuco, Brasil**. Maringá, v. 29, n. 3, p. 255-259, 2007.

TORRES FILHO, H. M. **Eletroforese de Proteínas**. Richet Nouvelles. Ano 11, N.3, Setembro, 4p., 2008.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 273, de 05 de março de 2008. **Método de referência para a detecção de leite de vaca e de caseinatos provenientes de leite de vaca em queijos de leite de ovelha, leite de cabra ou leite de búfala ou de misturas de leites de ovelha, cabra e búfala**. Jornal Oficial da União Europeia, Anexo IX, p. 53, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba, 2007.

WALSTRA, P. **Casein sub-micelles: do they exist**. International Dairy Journal 9, p. 189-192, 1999.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. Nova York: John Wiley e Sons. 1984.

WOODFORD, K. B. **A2 milk, farmer decisions, and risk management**. In Proceedings of the 16th International Farm Management Congress: Peer reviewed papers (pp. 641-648). England: International Farm Management Association, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1: TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO



TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO, QUE ENTRE SI CELEBRAM A EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA E A ALUNA: Debora Cristina Jesus, COM A INTERVENIÊNCIA DA INSTITUIÇÃO DE ENSINO Universidade Federal do Paraná.

A EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa, Empresa pública federal, vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, criada por força da Lei n.º 5.851, de 07/12/72, novo Estatuto aprovado pelo Decreto nº 2.291, de 04.08.97, por intermédio de sua Unidade Embrapa Gado de Leite, inscrita no CNPF/MF sob o n.º 00.348.003/0013-54, sediada em Juiz de Fora / MG, Rua Eugênio do Nascimento 610, Dom Bosco - CEP: 36038-330, neste ato representado por seu Chefe Adjunto Administrativo, Sr. Antônio Vander Pereira, doravante designada simplesmente **Embrapa**, e, de outro lado, a aluna **Debora Cristina Jesus**, brasileira, casada, data de nascimento 24/02/81, portadora do RG nº 8.110.580-4, Órgão Expedidor: SSP-PR, data de expedição: 28/03/07, inscrita no CPF/MF sob o N.º 039.643.599-80, residente e domiciliada em São José dos Pinhais, endereço Anneliese Gellert Kringsner, 3074, Bloco 8-apto.16, Afonso Pena, doravante designado simplesmente **Estudante**, com a interveniência da Instituição de Ensino Universidade Federal do Paraná, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 75.095.679/0001-49, sediada em Curitiba, endereço XV de Novembro, nº1299, neste ato representada por seu Prof. Dr. João Antonio Scandolera, Coordenador do Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, doravante designada simplesmente **Instituição de Ensino**, resolveram celebrar o presente TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO, que será regido pela Lei nº 11.788, de 25.09.2008, e respectivas alterações subsequentes, bem como pelas seguintes cláusulas e condições:

CLÁUSULA PRIMEIRA – Da Vinculação ao Convênio

Este Termo de Compromisso vincula-se, para todos os efeitos legais, ao Convênio de Concessão de Estágio celebrado em 02/01/2012, entre a **Embrapa** e a **Instituição de Ensino**, registrado no SAIC/Embrapa sob o nº: 21500.12/0002-3.

CLÁUSULA SEGUNDA – Do Curso ou Programa

A **Estudante** é aluna formalmente matriculada/inscrita e com frequência regular no Curso/Programa Zootecnia, iniciado no 1º semestre do ano de 2006 e com sua conclusão prevista para o 1º semestre do ano de 2013, tudo de conformidade com a declaração específica da **Instituição de Ensino** à qual se vincula o citado Curso/Programa, declaração esta que passa a integrar o presente Termo de Compromisso como Anexo I.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7417 - Fax: (32) 3311-7418
estagio@cnpq.embrapa.br



Gado de Leite

CLÁUSULA TERCEIRA – Do Objeto

A **Embrapa**, por este instrumento, concede, à **Estudante**, estágio com vistas a complementar sua formação educacional e à sua preparação para o trabalho produtivo, com sua efetiva atuação nas atividades pertinentes à área de Genética Molecular, junto ao Órgão/Departamento/Setor: Sede de sua Unidade: Embrapa Gado de Leite situada no endereço discriminado no preâmbulo deste instrumento, em consonância com o "PLANO DE ESTÁGIO" que, rubricado pelas partes e pela Instituição de Ensino, integra este Termo de Compromisso como Anexo II.

SUBCLÁUSULA ÚNICA: *Supervisionará o estágio do estudante o empregado Marta Fonseca Martins Guimarães*

CLÁUSULA QUARTA – Da jornada de atividade

A **Estudante** obriga-se a cumprir uma jornada de atividade de 8 (oito) horas diárias e 40 horas semanais.

SUBCLÁUSULA PRIMEIRA: A **Estudante** em nível de pós-graduação deverá estar vinculado a um projeto de pesquisa ou processo da Unidade da **Embrapa**, cujo objetivo esteja relacionado ao tema do trabalho de conclusão do curso a ser elaborado.

SUBCLÁUSULA SEGUNDA: A jornada de atividade da **Estudante** poderá ser flexibilizada pelo empregado supervisor, desde que mantida sua supervisão e a carga horária definida nesta cláusula.

SUBCLÁUSULA TERCEIRA: A critério do empregado supervisor, poderá ser adotado o sistema de compensação de horas, quando compatível com a jornada de atividade definida nesta cláusula.

SUBCLÁUSULA QUARTA: *Se a instituição de ensino adotar verificações de aprendizagem periódicas ou finais, nos períodos de avaliação, devidamente comprovados, a carga horária do estágio será reduzida à metade.*

CLÁUSULA QUINTA – Das Obrigações Especiais

Sem prejuízo do disposto nas demais cláusulas deste instrumento, a **Estudante** obriga-se especialmente ao seguinte:

- a) atuar com zelo e dedicação na execução de suas atribuições, de forma a evidenciar desempenho satisfatório nas avaliações periódicas a serem realizadas pelo Empregado Supervisor do estágio;
- b) cumprir fielmente todas as instruções, recomendações de normas relativas ao estágio emanadas da Instituição de Ensino e da Embrapa, em especial as constantes do "Plano de Estágio";
- c) manter total reserva em relação a quaisquer dados ou informações a que venha ter acesso em razão de sua atuação no cumprimento do estágio, não repassando-as a terceiros sob qualquer forma ou pretexto, sem prévia autorização formal da Embrapa, independentemente de se tratar ou não de informação reservada, confidencial ou sigilosa;

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7417 - Fax: (32) 3311-7418
estagio@cnpq.embrapa.br



Gado de Leite

- d) preencher e assinar a proposta de seguro de acidentes pessoais referente ao Plano de Seguro de Vida em Grupo da Embrapa no ato da celebração deste instrumento;
- e) responsabilizar-se por qualquer dano ou prejuízo que venha a causar ao patrimônio da Embrapa por dolo ou culpa;
- f) manter assiduidade e aproveitamento escolar satisfatórios em relação ao curso/programa de que trata a cláusula segunda durante a vigência do estágio;
- g) manter conduta compatível com a ética, os bons costumes e a probidade administrativa no desenvolvimento de estágio, evitando a prática de atos que caracterizem falta grave;
- h) não manter vínculo de emprego com terceiro, enquanto estiver realizando estágio na **Embrapa**;
- i) observar a regulamentação interna da **Embrapa** no exercício de suas atividades, conforme orientação do empregado supervisor.

CLÁUSULA SEXTA – Do Acesso às Instalações

O acesso à infra-estrutura e instalações da **Embrapa**, pela **Estudante**, será o estritamente necessário à execução das atividades objeto do estágio, observada a regulamentação interna da **Embrapa**.

CLÁUSULA SÉTIMA – Dos Resultados

A exploração, a qualquer título, dos resultados dos trabalhos realizados pela **Estudante**, privilegiáveis ou não, pertencerá automática e exclusivamente à **Embrapa**, especialmente Direitos da Propriedade Industrial, Direito sobre Cultivares e Direitos Autorais.

CLÁUSULA OITAVA – Do Seguro

A **Embrapa** obriga-se a contratar e a custear, direta ou indiretamente, seguro de acidentes pessoais em favor da **Estudante**, que tenham como causa direta o desempenho das atividades decorrentes do estágio, pela seguradora Tokio Marine Seguradora S.A. - Apólice nº 930002415.

CLÁUSULA NONA – Do Recesso

É assegurado à **Estudante**, sempre que o estágio tenha duração igual ou superior a 1 (um) ano, um período de recesso de 30 (trinta) dias, a ser gozado preferencialmente durante suas férias escolares.

SUBCLÁUSULA ÚNICA: Os dias de recesso previstos nesta cláusula serão concedidos de maneira proporcional nos casos de o estágio ter duração inferior a 1 (um) ano.



4

CLÁUSULA DÉCIMA – Do certificado de estágio

Ao término do estágio com aproveitamento, a **Embrapa** emitirá o correspondente certificado de estágio, do qual constará:

- a) a identificação da **Estudante** (nome, nacionalidade, RG, CPF e outros);
- b) a identificação do curso e da **Instituição de Ensino** freqüentados pela **Estudante**;
- c) a unidade de lotação;
- d) o período de realização do estágio e respectiva carga horária;
- e) as atividades desenvolvidas no estágio, conforme previsto no plano de estágio; e
- f) a avaliação quanto ao aproveitamento da **Estudante**.

SUBCLÁUSULA ÚNICA: A emissão do certificado de estágio ficará condicionada à entrega, pela **Estudante**, da seguinte documentação:

- a) nada consta da biblioteca da Embrapa;
- b) freqüências apuradas;
- c) formulário de avaliação da **Estudante** preenchido, assinado e datado pelo empregado supervisor;
- d) formulário de avaliação do estágio preenchido, assinado e datado pelo estagiário;
- e) crachá, quando for utilizado;
- f) relatório do projeto, caso a **Estudante** esteja vinculada a algum.

CLÁUSULA DÉCIMA PRIMEIRA – Da Vigência

O estágio terá vigência inicial de 03 (três) meses (450 Horas), com início em 05/11/12 e término em 05/02/13, podendo ser prorrogado, no interesse das partes, mediante celebração de Termo Aditivo por iguais períodos, até completar o limite máximo de 2 (dois) anos, observadas as condições legais específicas e as exigências regulamentares da **Instituição de Ensino**.

CLÁUSULA DÉCIMA SEGUNDA – Da Rescisão

A Embrapa poderá rescindir o presente Termo de Compromisso, independentemente de prévia interpelação judicial ou extrajudicial, por descumprimento de qualquer de suas cláusulas ou condições pela **Estudante**, respondendo este pelos prejuízos ocasionados, salvo hipótese de caso fortuito ou de força maior.

SUBCLÁUSULA ÚNICA: Além do acima exposto, o presente Termo de Compromisso extingui-se automaticamente nas seguintes hipóteses:

- a) conduta reprovável da **Estudante** no ambiente de trabalho;
- b) conclusão, abandono de curso ou trancamento da matrícula pela **Estudante** junto à **Instituição de Ensino** interveniente;
- c) quando atingido o prazo limite de 2 (dois) anos;
- d) ao final do prazo estabelecido no Termo de Compromisso de Estágio, se o mesmo não for prorrogado;



Gado de Leite

- e) extinção do convênio com a **Instituição de Ensino**;
- f) insuficiência de desempenho do estagiário no cumprimento do plano de estágio;
- g) *pela ausência injustificada por 8 (oito) dias consecutivos ou 15 (quinze) dias intercalados no período de 30 (trinta) dias.*

CLÁUSULA DÉCIMA TERCEIRA – Da Denúncia

Quaisquer das partes, independentemente de justo motivo e quando bem lhe convier, poderá denunciar o presente Termo de Compromisso, desde que o faça por escrito, mediante aviso prévio de, pelo menos, 05 (cinco) dias úteis.

CLÁUSULA DÉCIMA QUARTA – Do Foro

Para solução de quaisquer controvérsias porventura oriundas da execução deste Convênio, as partes elegem o Foro da Justiça Federal, Seção Judiciária de Juiz de Fora.

Estando assim justas e acordes, firmam o presente em 03 (três) vias de igual teor e forma, para um só efeito legal, na presença das testemunhas instrumentárias abaixo nomeadas e subscritas.

Juiz de Fora, 05 de novembro de 2012


Antônio Vander Pereira
 Chefe-Adjunto de Administração
 EMBRAPA GADO DE LEITE

Pela Embrapa


Edir Guerakius Nery
 Seção de Documentação e Certificação
 Coordenação Geral de Estágios

Pela Instituição de Ensino


Prof. Dr. Antonio João Scandolera
 Coordenador do Curso de Zootecnia
 UFRR - Matrícula 186147


Debora Cristina Jesus

Testemunhas:

Nome: GUILIANO HENRIQUE DE MARCHI Nome:
 CPF: 057.869.799-83 CPF: 424.231.969-20

ANEXO 2. PLANO DE ESTÁGIO



Gado de Leite

PLANO DE ESTÁGIO

IDENTIFICAÇÃO DO ESTAGIÁRIO:

Nome: DEBORA CRISTINA JESUS

Série/Curso/Nº Matrícula: ZOOTECNIA/GRR20060942

Instituição de Ensino: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IDENTIFICAÇÃO DO SUPERVISOR

Nome: Marta Fonseca Martins

Cargo: Pesquisador A

Formação: Bióloga - MS e DS em Genética e Melhoramento

LOCALIDADE – NÚCLEO – ÁREA DO ESTÁGIO

JUIZ DE FORA – EMBRAPA GADO DE LEITE – GENÉTICA MOLECULAR

PERÍODO DO ESTÁGIO:

05/11/2012 à 05/02/2013

CARGA HORÁRIA SEMANAL:

40h/SEMANAIS

SUBPROJETO/PA (Número e Nome):

02.11.04.005.00.00 - Desenvolvimento e Validação de Metodologias para Garantia da Qualidade, Segurança, Valor Nutricional e Detecção de Fraude em Leite e Produtos Lácteos

PROGRAMAÇÃO DE ATIVIDADES


- ✓ Preparo de soluções, curva-padrão para quantificação de proteínas
- ✓ Operação do equipamento Bioanalyzer e análise de dados com a finalidade de detecção de fraude em produtos lácteos.
- ✓ Produzir, em co-autoria com pesquisadores e/ou analistas da Embrapa Gado de Leite, obras passíveis de proteção por propriedade intelectual, citando dentre eles, mas sem a eles se limitar, trabalhos a serem publicados em anais de congressos, periódicos indexados, revistas de divulgação ou qualquer outro veículo de divulgação de trabalhos técnico-científicos, bem como em livros, manuais, etc.

Atenção:

1. As atividades a serem executadas no período do estágio deverão ser relacionadas em tópicos, de forma simples e objetiva, pois constarão no Certificado;
2. A atividade: "Produzir, em co-autoria manuais, etc." é comum e obrigatória a todos os Estudantes.

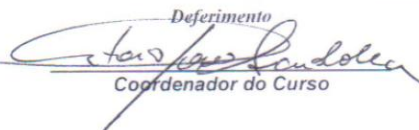
De acordo:


Supervisor do Estagiário na Embrapa


Orientador na Instituição de Ensino

Juliana B.B. Maurer
Dep. Bioquímica e
Oxi. Mol
Matr 135240


Estagiário


Coordenador do Curso

Prof. Dr. Antonio João Scandolera
Coordenador do Curso de Zootecnia
UFPR - Matrícula 186147

ANEXO 3. TERMO ADITIVO DO TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO



TERMO ADITIVO Nº 001 AO TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO FIRMADO EM 05/11/2012, QUE ENTRE SI CELEBRAM A EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA E O(A) ALUNO(A) Debora Cristina Jesus, COM INTERVENIÊNCIA DA INSTITUIÇÃO DE ENSINO: Universidade Federal do Paraná.

A **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa**, Empresa pública federal, vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, criada por força da Lei n.º 5.851, de 07/12/72, novo Estatuto aprovado pelo Decreto nº 2.291, de 04.08.97, por intermédio de sua Unidade Embrapa Gado de Leite, inscrita no CNPF/MF sob o n.º 00.348.003/0013-54, sediada em Juiz de Fora / MG, Rua Eugênio do Nascimento 610, Dom Bosco - CEP: 36038-330, neste ato representado por seu Chefe Adjunto Administrativo, Sr. Antônio Vander Pereira, doravante designada simplesmente **Embrapa**, e, de outro lado, o(a) aluno(a) Debora Cristina Jesus, brasileira, casada, data de nascimento 24/02/1981, portadora do RG nº 8.110.580-4, Órgão Expedidor: SSPR, data de expedição: 28/03/2007, inscrito no CPF/MF sob o N.º 039.643.599-80, residente e domiciliada em São José dos Pinhais, endereço Anneliese Gellert Krigner, 3074, Bloco 8-apto. 16, Afonso Pena, doravante designado simplesmente Estudante, com a interveniência da Instituição de Ensino Universidade Federal do Paraná, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 75.095.679/0001-49, sediada em Curitiba/PR, endereço: XV de Novembro, nº 1299, neste ato representada por seu (Reitor/Diretor etc.) _____, nome do representante legal _____, doravante designada simplesmente Universidade Federal do Paraná, resolveram celebrar o presente TERMO ADITIVO Nº 001 AO TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO, que será regido pela Lei nº 11.788, de 25.09.2008, e respectivas alterações subsequentes, bem como pelas seguintes cláusulas e condições:

CLÁUSULA PRIMEIRA – Da prorrogação

A vigência do TERMO DE COMPROMISSO DE ESTÁGIO, firmado entre as partes em 05/11/12 até 05/02/13, fica prorrogado por 10 (dez) dias, passando a vigorar de 06/02/2013 até 15/02/2013.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
 Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
 Telefone: (32) 3311-7417 - Fax: (32) 3311-7418
 estagio@cnpq.embrapa.br

Prof. Dr. Antonio João Scandolera
 Coordenador do Curso de Zootecnia
 UFPR - Matrícula 186147



Gado de Leite

CLÁUSULA SEGUNDA – Da ratificação

Ficam ratificadas as demais cláusulas e condições estipuladas no Termo de Compromisso ora aditado que não foram alteradas por este Termo Aditivo.

E, por estarem assim ajustadas, as partes firmam o presente instrumento em 03 (três) vias de igual teor e forma, na presença das duas testemunhas abaixo nomeadas e subscritas.

Juiz de Fora, 04 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. Antonio João Scandolera
Coordenador do Curso de Zootecnia
UFPR - Matrícula 186147

Antônio Vander Pereira
Chefe-Adjunto de Administração
EMBRAPA GADO DE LEITE
Pela Embrapa

Lilian Deluy M. Demargo Franzoni
Coordenadora Geral de Estágios
Por delegação de competência do Reitor
Portaria nº. 847/91
Pela Instituição de Ensino

Debora Cristina Jesus
Pela Instituição de Ensino

Testemunha:

Nome: AÍREA SANTOS
CPF: 724 231 969-20

Testemunha:

Nome: OSWALDO MUELLER JR
CPF: 44767722934

ANEXO 4. PLANO DE ESTÁGIO ADITIVO



Gado de Leite

PLANO DE ESTÁGIO

IDENTIFICAÇÃO DO ESTAGIÁRIO:

Nome: DEBORA CRISTINA JESUS

Série/Curso/Nº Matrícula: ZOOTECCNIA/GRR20060942

Instituição de Ensino: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IDENTIFICAÇÃO DO SUPERVISOR

Nome: Marta Fonseca Martins

Cargo: Pesquisador A

Formação: Bióloga - MS e DS em Genética e Melhoramento

LOCALIDADE – NÚCLEO – ÁREA DO ESTÁGIO

JUIZ DE FORA – EMBRAPA GADO DE LEITE – BIOLOGIA MOLECULAR

PERÍODO DO ESTÁGIO:

05/11/2012 à 15/02/2013

CARGA HORÁRIA SEMANAL:

40h/SEMANAIS

SUBPROJETO/PA (Número e Nome):

02.11.04.005.00.00 - Desenvolvimento e Validação de Metodologias para Garantia da Qualidade, Segurança, Valor Nutricional e Detecção de Fraude em Leite e Produtos Lácteos

PROGRAMAÇÃO DE ATIVIDADES

- ✓ Preparo de soluções, curva-padrão para quantificação de proteínas
- ✓ Operação do equipamento Bioanalyzer e análise de dados com a finalidade de detecção de fraude em produtos lácteos.
- ✓ Produzir, em co-autoria com pesquisadores e/ou analistas da Embrapa Gado de Leite, obras passíveis de proteção por propriedade intelectual, citando dentre eles, mas sem a eles se limitar, trabalhos a serem publicados em anais de congressos, periódicos indexados, revistas de divulgação ou qualquer outro veículo de divulgação de trabalhos técnico-científicos, bem como em livros, manuais, etc.

Atenção:

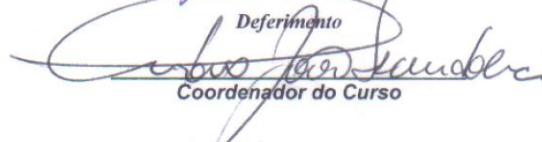
1. As atividades a serem executadas no período do estágio deverão ser relacionadas em tópicos, de forma simples e objetiva, pois constarão no Certificado;
2. A atividade: "Produzir, em co-autoria manuais, etc." é comum e obrigatória a todos os Estudantes.

De acordo:


Supervisor do Estagiário na Embrapa


Orientador na Instituição de Ensino


Estagiário


Deferimento
Coordenador do Curso

ANEXO 5: FICHA DE CONTROLE DE FREQUÊNCIA



Gado de Leite

FOLHA DE FREQUÊNCIA

Nome: Debora Cristina Jesus

Supervisor: Marta Fonseca Martins

Mês: Novembro	Ano: 2012	CH Semanal: 40 hrs
---------------	-----------	--------------------

Dia	MANHÃ		TARDE		Saldo	Observação
	Entrada	Saída	Entrada	Saída		
01	--	--	--	--	--	
02	--	--	--	--	--	
03						Sábado
04						Domingo
05	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
06	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
07	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
08	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
09	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
10						Sábado
11						Domingo
12	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
13	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
14	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
15	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
16	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
17						Sábado
18						Domingo
19	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
20	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
21	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
22	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
23	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
24						Sábado
25						Domingo
26	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
27	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
28	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
29	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
30	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	

ATENÇÃO: De acordo com a norma da Embrapa, a carga horária semanal não poderá exceder a estabelecida no Termo de Compromisso.

Debora Cristina Jesus
Assinatura

Marta Fonseca Martins
Assinatura do Supervisor



Gado de Leite

FOLHA DE FREQUÊNCIA

Nome: Debora Cristina Jesus

Supervisor: Marta Fonseca Martins

Mês: Dezembro	Ano: 2012	CH Semanal: 40 hrs
---------------	-----------	--------------------

Dia	MANHÃ		TARDE		Saldo	Observação
	Entrada	Saída	Entrada	Saída		
01						Sábado
02						Domingo
03	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
04	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
05	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
06	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
07	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
08						Sábado
09						Domingo
10	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
11	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
12	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
13	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
14	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
15						Sábado
16						Domingo
17	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
18	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
19	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
20	8:00	12:00	--	--	4h	
21	--	--	--	--	--	
22						Sábado
23						Domingo
24	--	--	--	--	--	Férias
25	--	--	--	--	--	
26	--	--	--	--	--	
27	--	--	--	--	--	
28	--	--	--	--	--	
29	--	--	--	--	--	
30	--	--	--	--	--	
31	--	--	--	--	--	

ATENÇÃO: De acordo com a norma da Embrapa, a carga horária semanal não poderá exceder a estabelecida no Termo de Compromisso.

Debora Cristina Jesus
Assinatura

Marta Fonseca Martins
Assinatura do Supervisor



Gado de Leite

FOLHA DE FREQUÊNCIA

Nome: Debora Cristina Jesus

Supervisor: Marta Fonseca Martins

Mês: Janeiro	Ano: 2013	CH Semanal: 40 hrs
--------------	-----------	--------------------

Dia	MANHÃ		TARDE		Saldo	Observação
	Entrada	Saída	Entrada	Saída		
01						Feriado
02	----	----	----	----	----	
03	----	----	----	----	----	
04	----	----	----	----	----	
05						Sábado
06						Domingo
07	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
08	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
09	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
10	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
11	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
12						Sábado
13						Domingo
14	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
15	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
16	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
17	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
18	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
19						Sábado
20						Domingo
21	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
22	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
23	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
24	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
25	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
26						Sábado
27						Domingo
28	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
29	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
30	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
31	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	

ATENÇÃO: De acordo com a norma da Embrapa, a carga horária semanal não poderá exceder a estabelecida no Termo de Compromisso.

Debora Cristina Jesus
Assinatura

Marta Fonseca Martins
Assinatura do Supervisor



Gado de Leite

FOLHA DE FREQUÊNCIA

Nome: Debora Cristina Jesus

Supervisor: Marta Fonseca Martins

Mês: Fevereiro	Ano: 2013	CH Semanal: 40 hrs
----------------	-----------	--------------------

Dia	MANHÃ		TARDE		Saldo	Observação
	Entrada	Saída	Entrada	Saída		
01	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
02						Sábado
03						Domingo
04	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
05	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
06	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
07	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
08	8:00	12:00	13:00	17:00	8h	
09						Sábado
10						Domingo
11	--	--	--	--	--	
12	--	--	--	--	--	
13	--	--	--	--	--	
14	--	--	--	--	--	
15	--	--	--	--	--	
16						Sábado
						Domingo
18	--	--	--	--	--	
19	--	--	--	--	--	
20	--	--	--	--	--	
21	--	--	--	--	--	
22	--	--	--	--	--	
23						Sábado
24						Domingo
25	--	--	--	--	--	
26	--	--	--	--	--	
27	--	--	--	--	--	
28	--	--	--	--	--	
29	--	--	--	--	--	
30						Sábado
31						Domingo

ATENÇÃO: De acordo com a norma da Embrapa, a carga horária semanal não poderá exceder a estabelecida no Termo de Compromisso.

Debora Cristina Jesus
Assinatura

Marta Fonseca Martins
Assinatura do Supervisor

ANEXO 6: FICHA DE AVALIAÇÃO NO LOCAL DE ESTÁGIO

*Gado de Leite*

RELATÓRIO

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Debora Cristina Jesus

Supervisor: Marta Fonseca Martins

Setor/Área: Laboratório de Genética Molecular / Biologia Molecular

Período do Relatório: de 05/Novembro/2012 a 15/Fevereiro/2013

RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DE ESTÁGIO

O principal objetivo do estágio foi desenvolver atividades referentes a ações dentro do projeto de "Desenvolvimento e Validação de Metodologias para Garantia da Qualidade, Segurança, Valor Nutricional e Detecção de Fraude em Leite e Produtos Lácteos". O tema do Trabalho de Conclusão de Curso é "Detecção de fraude no leite de caprino com adição de leite bovino", utilizando o método de eletroforese microfluídica através da tecnologia Agilent 2100 Bioanalyzer. Além de outras atividades relacionadas a projetos em execução no Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa e participações em eventos. As atividades desenvolvidas foram:

- Operação do equipamento 2100 Bioanalyzer e análise dos dados com a finalidade de detectar fraude em produtos lácteos.
- Preparo de soluções, curva-padrão para quantificação de proteínas utilizando o método de Bradford por espectrofotometria em ultravioleta no aparelho NanoDrop ND-1000.
- Pesquisa bibliográfica relativa ao tema proposto.
- Acompanhamento e auxílio na extração de DNA de sangue e extração de DNA de sêmen.
- Acompanhamento de extração de RNA de glândula mamária de vacas para estudo da expressão gênica de resistência à mastite.
- Colaboração na produção de resumo para o Congresso de Higienistas de Alimentos 2013.
- Participação do "Workshop de Zootecnia de Precisão na Pecuária de Leite no Brasil" na Embrapa Gado de Leite.
- Visita ao Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco/MG.
- Participação no curso de "Melhoramento Genético de Bovinos de Leite" na Embrapa

Gado de Leite.

- Participação no treinamento do "Bioanalyzer eletroforese microfluidica" na Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF.
- Acompanhamento das atividades do Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite.

COMENTÁRIOS


Todos os esforços para estagiar na empresa Embrapa Gado de Leite foram recompensados pela grande experiência adquirida durante o período de trabalho. Conhecer a organização e o funcionamento desta instituição será muito relevante nas futuras tomadas de decisões na minha vida profissional.

Assinatura: Alvaro Cristina Jesus

Atenção: as atividades deverão ser descritas de forma objetiva, em tópicos, e em conformidade com o Planejamento, pois constarão no Certificado.

PARECER DO SUPERVISOR

Use a escala de 6 a 10

6 = Insuficiente	7 = Fraco	8 = Regular	9 = Bom	10 = Excelente
1. Organização e método de trabalho (Uso de meios adequados ao bom desenvolvimento do trabalho).				
				(9)
2. Capacidade para execução dos trabalhos (Conhecimento e habilidade na execução de tarefas)				
				(8)
3. Cooperação (Disposição para colaborar com terceiros)				
				(10)
4. Assiduidade (Constância e pontualidade no cumprimento dos horários e dias de trabalho)				
				(10)
5. Responsabilidade (Uso adequado dos bens e equipamentos; dedicação e desempenho)				
				(10)
6. Consulta a biblioteca visando à atualização				
				(10)
• Rendimento (Somatório das notas dividido pelo número de itens avaliados)				
				(9,5)
Assinatura do supervisor: <u></u>				