

# Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida

## Characterization of milk powder, whey powder and its blends by polyacrylamide gel electrophoresis

RIALA6/1400

Felippe Macedo MARQUES<sup>1</sup>, Jaqueline Flaviana Oliveira de SÁ<sup>2\*</sup>, Marcelo Cerqueira dos SANTOS<sup>3</sup>, Marta Fonseca MARTINS<sup>4</sup>, Marco Antonio Moreira FURTADO<sup>5</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Rua Tenente Freitas, 116 - Santa Terezinha. Juiz de Fora/MG. CEP 36045.560. Telefone: 32-3224-3116. e-mail: jaquelinesa@epamig.br

<sup>1</sup>Oxetil-FGF

<sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba (IF SUDESTE MG)

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite

<sup>5</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Recebido: 23.05.2011 – Aceito para publicação: 05.11.2011

### RESUMO

Pela legislação brasileira o leite em pó não pode conter sólidos de soro de leite. As autoridades competentes enfrentam dificuldades no controle desse tipo de fraude, apesar de diversos métodos terem sido estudados e propostos para detectar a adulteração. Neste estudo foi realizada a caracterização do leite em pó, utilizando-se a técnica de eletroforese adaptada, para determinar adulteração em amostras de leite em pó contendo diferentes concentrações de soro (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) e pelos perfis protéicos. Foi empregada a técnica de SDS-PAGE com modificações nos procedimentos de conservação dos géis após preparo, tempo entre preparo e aplicação, voltagem e corrente na fonte eletroforética, tempos de revelação e secagem, obtendo-se géis com resultados satisfatórios quando analisados por meio de *software* Image Quant TL. A técnica de SDS-PAGE adaptada foi eficiente para avaliar as características das amostras de leite em pó e de soro em pó separadamente. Houve possibilidade de identificar a adição de soro de leite, porém sem discernimento da correlação entre o nível de adição e a quantidade de soro adicionada. A SDS-PAGE modificada mostrou bom desempenho na caracterização de proteínas de leite em pó, de soro de leite em pó e de suas misturas.

**Palavras-chave.** eletroforese, proteínas, adulterações, SDS-PAGE.

### ABSTRACT

According to the Brazilian legislation the sterile pasteurized milk and the milk powder should not contain cheese whey solids. Although several methods have been studied and proposed for detecting this adulteration, it has been hard to be controlled by the competent authorities. This study characterized the milk powder by using a modified electrophoresis technique for determining the adulteration of milk powder samples containing different concentrations of whey (2%, 4%, 6%, 8% and 10%), and by analyzing the protein profiles. Modifications in the SDS-PAGE technique procedures were done on the prepared gel preservation, the time between preparation and application, the electrophoretic source current and voltage and on the gel developing and drying time, which produced an satisfactory effect on the final results. The adapted technique showed to be efficient for characterizing the milk powder and whey powder samples separately. Addition of whey was identified, but the correlation between the adulteration level and the added amount of whey could not be determined. The adapted SDS-PAGE technique showed a suitable performance for assessing the milk protein powder, whey powder and its blended products characteristics.

**Keywords.** electrophoresis, proteins, adulteration, SDS-PAGE.

## INTRODUÇÃO

A qualidade do leite consumido é uma constante preocupação de técnicos, autoridades e demais profissionais nacionais e internacionais, ligados à área de saúde, laticínios e dos consumidores<sup>1</sup>. O soro de leite em pó tornou-se um importante componente de muitos produtos formulados. O aproveitamento deste sub-produto deve ser incentivado a fim de que se possa usufruir do seu considerável valor nutricional e, preservar a natureza do impacto ambiental representado pela eliminação do mesmo sem o adequado tratamento<sup>2</sup>. Contudo, sua adição aos produtos comercializados com a denominação de leite em pó constitui fraude contra a economia popular<sup>3</sup>. Devido ao preço reduzido do soro com relação ao leite, e a complexidade destas misturas, essa prática é alvo atrativo de adulterações<sup>4</sup>.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção desse tipo de fraude: composição de aminoácidos (cistina e cisteína; ácido aspártico, alanina e prolina); relação entre constituintes (relação nitrogênio soroproteico/nitrogênio caseínico); método crioscópico; observação microscópica com luz polarizada; imunoenzimático; cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); determinação do ácido siálico livre; entre outros<sup>5-8</sup>. A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do CMP (Caseinomacropéptido). As caseínas do leite de vaca são compostas por aproximadamente 50%  $\alpha$ -caseína (incluindo a  $\alpha_1$ -caseína e  $\alpha_2$ -caseína), 30% de  $\beta$ -caseína, 15% de k-caseína e 5% de  $\gamma$ -caseína e as proteínas do soro de leite são constituídas de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, albumina do soro bovino, lactoferrina, imunoglobulinas e glicomacropéptidos<sup>9</sup>. A caseína é uma fosfoproteína que estabelece ligações com o cálcio, o que lhe confere certa estabilidade, motivo pelo qual não coagula no ponto de ebulição do leite<sup>10</sup>. A  $\alpha$ -lactoalbumina desnatura-se a 65,2 °C, em pH 6,7, sendo 90% da desnaturação revertida com resfriamento, essa alta capacidade de renaturar-se explica sua aparente resistência térmica<sup>11</sup>. A desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina é dependente do tempo de exposição à temperatura. Acima de 70 °C ocorrem extensivas alterações de conformação, com exposição de grupos SH e NH<sub>2</sub>. Sofre desnaturação de polimerização irreversível com a formação de ligações S-S intermoleculares<sup>12</sup>.

O Caseinomacropéptido (CMP) é um polipeptídeo resultante da quebra da ligação peptídica da

k-caseína entre os aminoácidos 105-106 (fenilalanina-metionina). Desta cisão, forma-se o paracaseinato de cálcio (1-105), hidrofóbico e insolúvel, pela agregação das micelas de caseína, e o caseinomacropéptido (106-169), hidrofílico e solúvel, que permanece no soro<sup>13</sup>. O CMP é liberado pela ação da quimosina durante a fase primária da coagulação do leite e por se tratar de um componente específico do soro e que deve estar ausente no leite, o CMP é um excelente indicador da presença de fraude por adição de soro ao leite<sup>13</sup>.

Métodos que utilizam eletroforese capilar têm sido utilizados com sucesso na identificação e quantificação deste CMP em leite<sup>13,14</sup>. Em experimentos conduzidos por Olieman e Riel<sup>15</sup>, utilizou-se CLAE em coluna de fase reversa (CLAE-FR) para estudar o comportamento da proteólise extensa no leite, causada por bactérias psicrotróficas. Alvin<sup>16</sup> fez um estudo da influência da qualidade do leite nos resultados do método de CLAE-FG (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Filtração em Gel), quando utilizado para detectar soro adicionado neste produto, e concluiu que os resultados positivos, quando há presença de CMP, podem ser interpretados como adição de soro ao leite, ou como provenientes da detecção de produtos de degradação proteica do leite de péssima qualidade. O maior inconveniente da determinação do CMP é a atividade proteolítica de enzimas termorresistentes liberadas por bactérias psicrotróficas em leite cru e a plasmina que permanece ativa no leite, pois estas podem acarretar liberação e surgimento de certa quantidade de CMP e outro peptídeo denominado "pseudo-CMP", devido à capacidade das enzimas proteolíticas de hidrolisar a caseína em locais parecidos com os locais hidrolisados pela quimosina<sup>17</sup>. Deste modo, toda análise baseada na identificação de CMP pode apresentar resultados falso-positivos, quanto à adição de soro de leite ao leite. Este pseudo-CMP pode diferir do CMP por um único aminoácido (metionina terminal no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107)<sup>18</sup>.

A legislação brasileira estabelece que o leite em pó deverá conter somente as proteínas, açúcares, gorduras e outras substâncias minerais do leite e nas mesmas proporções relativas deste, sendo aceitos como aditivos unicamente a lecitina, atuando como emulsionante, e alguns anti-umectantes<sup>19</sup>. Em concentrações de até 30 mg/L de CMP, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o índice de CMP no leite estiver entre 30mg/L e 75mg/L, este poderá ser destinado

à produção de derivados lácteos, e acima de 75mg/L, poderá ser destinado à alimentação animal ou à indústria química em geral<sup>3</sup>.

Outro método capaz de detectar a presença de CMP em leite pasteurizado e leite em pó foi desenvolvido por Vilela<sup>20</sup>, utilizando eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE) para realizar a separação e densitometria, para quantificação. Embora a metodologia apresente alta sensibilidade (0,5% de soro de leite adicionado), o tempo total de análise pode ser considerado longo, além de exigir condições especiais de análise. Entretanto, esta apresenta muitas vantagens em relação aos diversos métodos que têm sido estudados e propostos para a detecção da adulteração do leite com soro de leite, especialmente no que diz respeito ao custo dos materiais em geral, necessidade de especialistas qualificados dedicados ao método e custo dos equipamentos<sup>1</sup>.

O objetivo deste trabalho foi a adaptação de uma metodologia de eletroforese para determinar adulteração de leite em pó com diferentes concentrações de soro, por meio da verificação dos perfis protéicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Seguiu-se a metodologia proposta por Laemmli<sup>21</sup>, com algumas adaptações, devido à demora na corrida do processo clássico e à má resolução das bandas quando reveladas. As amostras de leite em pó foram adquiridas nos mercados da cidade de Juiz de Fora - MG entre agosto e dezembro de 2009, sendo analisadas seis diferentes marcas. O soro de leite em pó

foi adquirido de fornecedor industrial. Em laboratório, foram produzidas, cinco amostras fraudulentas, misturando-se soro de leite em pó nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10% ao leite em pó, sendo 100g a quantidade de mistura final preparada. O leite em pó e o soro de leite em pó foram reconstituídos a 12% em água destilada. Adicionou-se em microtubo, 24 µL de cada amostra reconstituída e 1 mL de tampão da amostra (4,0 mL de água destilada; 1,0 mL de Tris-HCl 0,5 mol/L em pH 6,8; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL SDS 10% m/v; 0,4 mL de 2-mercaptoetanol; 0,2 mL de azul de bromofenol 2% m/v). As amostras, após a dissolução no tampão de amostra, foram submetidas a 1000 °C por 5 minutos e centrifugadas em temperatura ambiente por 15 minutos a 12.500 x g. Utilizaram-se marcadores de baixa massa molecular (*Amersham Biosciences - Buckinghamshire, Inglaterra*), aplicados nos poços de números 2 e 13 e padrões α-caseína, β-caseína e κ-caseína de leite bovino (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*) - aplicados, respectivamente, nos poços de números 3, 4 e 5 de cada gel. Os poços dos extremos dos géis não foram utilizados. A seguir, foram aquecidos a 40 °C por 1 hora, sendo armazenados a -20 °C aproximadamente no próprio recipiente. Como marcadores moleculares foram utilizados fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina e α-lactoalbumina, variando de 14.400 Da a 97.000 Da. Os géis de separação e empilhamento foram preparados utilizando-se as soluções descritas na Tabela 1.

Estas soluções foram misturadas nas quantidades descritas e em seguida, colocadas nos

**Tabela 1.** Composição dos géis de poli(acrilamida) utilizados para eletroforese de proteínas das amostras de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas

Componentes	Gel de separação 12,5%	Gel de separação 15,0%	Gel de separação 15,5%	Gel de Concentração
Acrilamida/Bis (sol. estoque 30%)	12,5 mL	15 mL	15,5 mL	1,5 mL
Tampão *Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	2,5 mL
**SDS 10% m/v	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,1 mL
Água destilada	9,4 mL	6,9 mL	6,4 mL	5,9 mL
Persulfato de amônio	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,05 mL
***TEMED	30 µL	30 µL	30 µL	20 µL

\*TRIS = tris (hidroximetil) aminometano

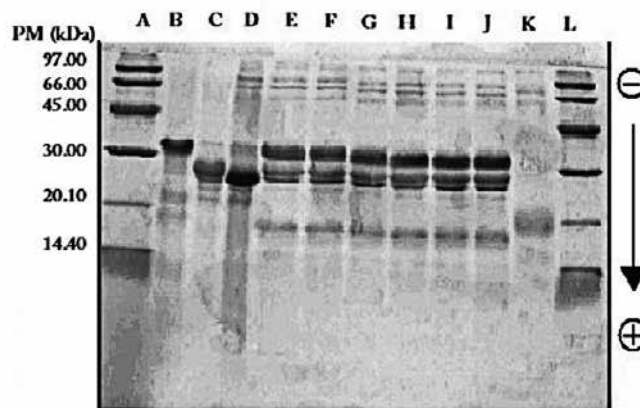
\*\*SDS = dodecil sulfato de sódio

\*\*\*TEMED = tetrametiletilenodiamina

moldes de vidro, até atingir a altura de 9,5 cm na placa. Uma fina camada de butanol foi colocada sobre esta solução, evitando-se assim a formação de um menisco côncavo, efeito provocado pela tensão superficial do gel. Após a preparação dos géis, as placas foram fixadas em cuba vertical (modelo Z35280-2, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA). Nos reservatórios das cubas, foi colocado tampão Tris-glicina, pH 8,3, diluído 1:5. Foram aplicados volumes que continham aproximadamente 30µg de proteínas. Fixou-se a voltagem em 60 V para o gel de empilhamento, com corrente livre e, 120 V para o gel de separação, mantendo a corrente livre. Ao término da corrida, os géis foram imersos em solução fixadora por 40 minutos. Em seguida, foram colocados em solução corante, por uma noite. A descoloração, onde se utilizou 500 mL de metanol, 200 mL de ácido acético e água destilada até completar 1000 mL de solução, transcorreu por 2 horas, até a completa evidenciação das bandas. Os géis foram imersos em solução de secagem por 15 minutos e secos pelo método do bastidor Alfenas<sup>22</sup>. Cada gel analisado corresponde a um tratamento, em duplicata, tendo em vista que o equipamento possibilitar a corrida simultânea de dois géis. As imagens dos géis foram escaneadas e posteriormente analisadas pelo *software Image Quant TL V2005* da Amersham Biosciences. Após a análise, o programa fornece dados sobre a distância percorrida pela fração de proteína em função da distância total, o que aqui foi denominado “mobilidade eletroforética relativa”, massa molecular (expressa em kDa) e volume de cada fração protéica analisada. A área da banda eletroforética então é vista como uma curva gaussiana. Algumas proteínas-padrão de massas moleculares conhecidas são usadas para a confecção de uma reta no gráfico de peso molecular versus mobilidade relativa, após a incubação em SDS e β-mercaptoetanol e a eletroforese desnaturante. A partir desta reta é possível estimar a massa molecular de uma proteína qualquer, submetida concomitantemente à mesma eletroforese<sup>23</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

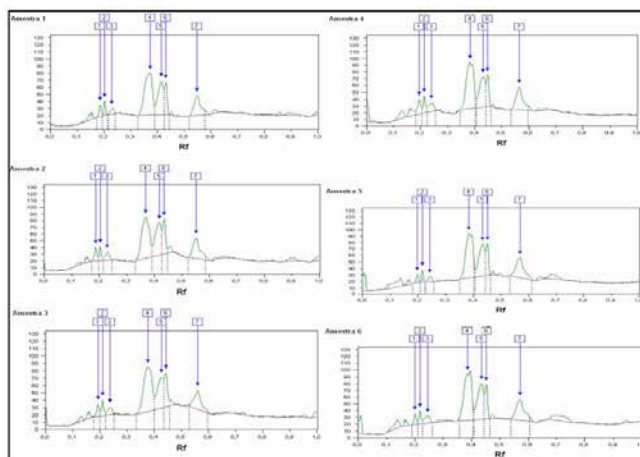
Verificou-se que, as massas moleculares na faixa da β-lactoglobulina e α-lactoalbumina ficaram prejudicadas nos géis de separação com concentrações de 12,5% e 15% de acrilamida, não permitindo a adequada caracterização das proteínas do soro. Deste modo, não foram executadas avaliações



**Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15,5%. A. padrão de massa molecular; B. α-caseína; C. β-caseína; D. κ-caseína; E. amostra de leite em pó 1; F. amostra de leite em pó 2; G. amostra de leite em pó 3; H. amostra de leite em pó 4; I. amostra de leite em pó 5; J. amostra de leite em pó 6; K. soro de leite em pó padrão; L. padrão de massa molecular

densitométricas dos géis nestas concentrações. Os géis de concentração 15,5% de acrilamida possibilitaram a análise correta pelo *software* específico, gerando valores de mobilidade eletroforética relativa e massas moleculares das respectivas frações protéicas. Os poços de E até J da Figura 1 representam perfis típicos de leite em pó, de acordo com trabalhos conduzidos em condições similares<sup>23,24</sup>.

As frações caseínicas aparecem na seguinte ordem crescente de mobilidade eletroforética: α<sub>s1</sub>; α<sub>s2</sub>; β; e κ-CN. Esta sequência concorda com os valores médios das massas moleculares das frações obtidas, onde os maiores picos de mobilidade eletroforética relativa, para



**Figura 2.** Densitogramas de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) relativos às amostras de leite em pó

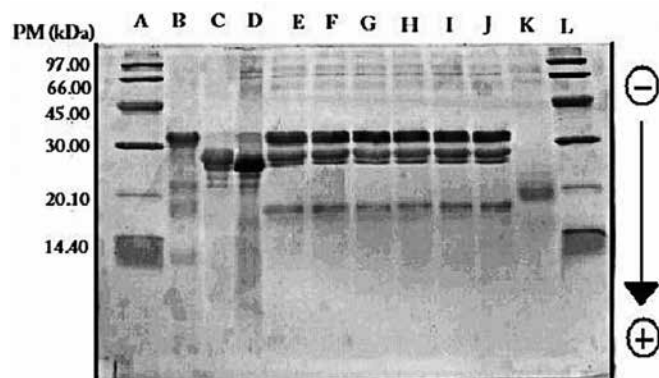
as frações caseínicas, devem ser correspondentes à  $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN e  $\kappa$ -CN (Figura 2) nesta ordem.

No presente trabalho, as bandas correspondentes a  $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$  encontram-se agrupadas em uma única faixa densitométrica, correspondente a  $\alpha$ -caseína cujo pico é o mais expressivo.

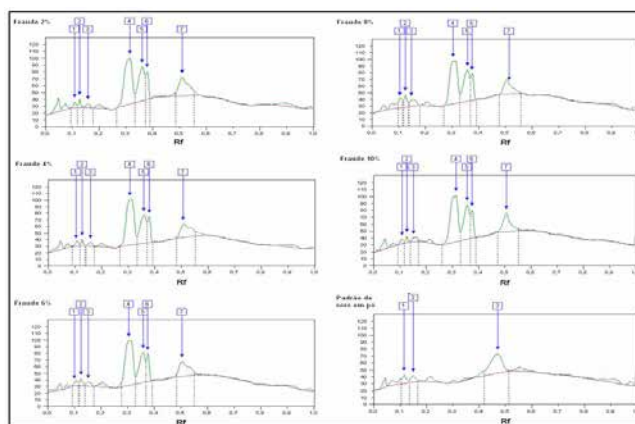
De acordo com Farrell Jr. et al.<sup>25</sup>, as massas moleculares das mais importantes frações caseínicas estão na faixa de 19,00 a 25,00 kDa. Neste experimento, elas parecem migrar até a faixa próxima ou maior que 30,00 kDa, o que demonstra que as caseínas exibem comportamento anormal nestas condições. Isto pode ser justificado pela ligação em proporções variadas ao SDS pelas diferentes frações caseínicas ou pela interação entre as frações caseínicas separadas.

A avaliação destes resultados mostra que os perfis das amostras de leite em pó apresentaram mínimas variações, principalmente nas frações caseínicas, permitindo assim sua caracterização. Embora os valores das massas moleculares detectadas sejam maiores que os descritos na literatura, sua sequência concorda com o perfil eletroforético das caseínas, já que os padrões apresentaram valores semelhantes.

A Figura 3 apresenta o perfil eletroforético das amostras de leite em pó, misturadas com soro, permitindo a identificação dos perfis típicos de leite em pó (poço E), soro de leite em pó (poço K) e misturas (poços F a J).



**Figura 3.** Perfil eletroforético das amostras de leite em pó, adulteradas com soro, obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Gel de separação com 15,5% de poliacrilamida. A. padrão de massa molecular; B.  $\alpha$ -caseína; C.  $\beta$ -caseína; D.  $\kappa$ -caseína; E. leite em pó padrão; F. mistura de leite em pó com 2% de soro em pó; G. mistura de leite em pó com 4% de soro em pó; H. mistura de leite em pó com 6% de soro em pó; I. mistura de leite em pó com 8% de soro em pó; J. mistura de leite em pó com 10% de soro em pó; K. soro de leite em pó padrão; L. padrão de massa molecular



**Figura 4.** Densitogramas de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) relativos ao soro em pó e suas misturas ao leite em pó. De acordo com Dzurec e Zall<sup>26</sup>, o tratamento térmico sofrido pelo leite em pó pode induzir associação entre proteínas do soro, como entre  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, o que é verificado pela presença de única banda na região destas proteínas<sup>26</sup>. Estudos mostram que, por meio de aquecimentos mais severos, a desnaturação de soroproteínas ocorre por associação entre proteínas do soro ou com micelas de caseína, podendo justificar o perfil observado<sup>27</sup>

Com relação ao soro (linha k), as bandas que apresentam mais alta coloração e, conseqüentemente, concentração, parecem se referir as frações lactoferrina, representada pelo pico de número 1, soro albumina bovina, representada pelo pico de número 2,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, representadas pelo pico de número 3 no respectivo densitograma da amostra (Figura 4).

Ao avaliar as amostras de leite em pó adicionadas de quantidades crescentes de soro em pó, observa-se que não há semelhança entre o padrão de leite em pó e as amostras de fraude, onde era esperado um aumento dos picos densitométricos nas frações protéicas do soro, como  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, não ocorrendo este acréscimo. Este fenômeno pode ser justificado por diversos fatores como a má homogeneização das amostras durante o preparo, solubilidade do soro em pó inferior à solubilidade do leite em pó, temperatura de dissolução das amostras não ideal, alíquota retirada não representativa da amostra ou a dispersão não uniforme do pó em solução. O trabalho realizado por Vilela<sup>20</sup> utilizando técnica SDS-PAGE similar à apresentada, mostrou-se eficaz na detecção de fraude em leite por adição de soro em pó. Entretanto, as amostras foram tratadas previamente, de modo a realizar a determinação a partir do glicomacropéptido.



## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Na técnica de SDS-PAGE, entre as concentrações de acrilamida testadas no gel de separação, a que apresentou melhor resolução das bandas protéicas foi a de 15,5%.
- As amostras de leite em pó são semelhantes quanto aos perfis eletroforéticos, possibilitando sua caracterização eletroforética, onde os picos de maior expressão foram os correspondentes a  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e k-caseína.
- O perfil eletroforético do soro em pó, apresentou única banda na faixa de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, provavelmente justificada pelo tratamento térmico empregado na secagem do soro.
- Nas condições analíticas empregadas, o método SDS-PAGE possibilitou apenas a visualização da presença do soro, entretanto, não se revelou eficiente no estabelecimento de uma boa correlação entre o nível da adulteração e a quantidade de soro adicionado.

## REFERÊNCIAS

1. Magalhães MA. 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]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2008.
2. Serpa L. Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração [dissertação de mestrado]. Erechim (RS): Universidade Regional Integrada; 2005.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui o critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado "Índice CMP", de que trata a IN 68 de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 de dez 2006. Seção 1, nº 239. p. 8.
4. De Souza EMT, Arruda SF, Brandão PO, Siqueira EMA. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(3): 314-7.
5. Carvalho BMAC, Lorendane M, Pereira Alcântara LA, Ferreira Bonomo RC. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. [acesso em 2011 Abr 18]. Disponível em: [http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060704.pdf].
6. Furtado MAM. Desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite pasteurizado [dissertação de mestrado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 1989.
7. Wolfschoon-Pombo AF, Furtado MAM. Detection of adulteration of pasteurised milk with whey by determination of the casein-bound phosphorus and protein nitrogen content. *Z. Lebensm-Unters.-Forsch., A Food Res Technol*. 1989; 188: 16-21.
8. Pereira DBC, Silva PHF, Júnior LCGC, Oliveira LL. Físico-Química do leite e derivados – Métodos Analíticos. Juiz de Fora (MG): Templo Gráfica e Editora Ltda; 2001.
9. Buraglia, BM. Detección de caseinato y suero em leche y productos lácteos mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectroscópicas [tese de doutorado]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2001.
10. Spreer, E. Lactologia industrial: leche, preparación y elaboración, maquinas, instalaciones e aparatos, productos lácteos. 2.ed: Zaragoza: Acribia; 1991
11. Spreer, E. Lactologia industrial. Zaragoza: Acribia; 1973.
12. Antunes, AJ. Funcionalidade de proteínas de soro de leite. Barueri (SP): Editora Manole; 2003.
13. Mollé D, Léonil J. Heterogeneity of the bovine K-casein caseinomacropetide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1995; 708(2):223-30.
14. Van Riel J, Olieman C. Determination of caseinomacropetide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis*. 1995; 16(4):529-33.
15. Olieman C, Van Riel JAM. Detection of rennet whey solids in skin milk and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. *Neth. Milk Dairy J*. 1989; 43: 171-89.
16. Alvin TC. Efeito da qualidade do leite na detecção do soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho filtração géllica (GF-HPLC) [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1992.
17. Recio I, Garcia-risco MR, Ramos M, Lòpez-fandino R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on Kappa-casein. *J Dairy Res*. 2000; 67(4):625-30.
18. Recio, I, Frutos M, Olano, A.; Ramos, M. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1996, 44(12):3955-9.
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no 369, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, nº 172. p. 19699.
20. Vilela SC. Deteccion de suero de queseria agregado a leche pasteurizada y leche em polvo. Determinación del glicomacropetido por electroforesis. [dissertação de mestrado]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 1987.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.

22. Alfenas AC, Peters-Robinson I, Brune W. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa, 1991.
23. Silva Jr JG. Eletroforese de proteínas. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2001.
24. Basch JJ, Junior FWD, Procino LG, Holsinger VH, Junior HMF. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *J Dairy Sci*. 1985; 68(1):23-31.
25. Farrel HMJr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al. Nomenclature of the proteins of cow's milk – Sixth Revision. *J Dairy Sci*. 2004; 87(6):1641-74.
26. Dzurec DJ, Zall RR. Effect of heating, cooling, and storing milk on casein and whey proteins. *J Dairy Sci*. 1985; 68(2): 273-80.
27. Law, AJR, Leaver, J. Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *J Agric Food Chem*. 2000; 48: 672-9.