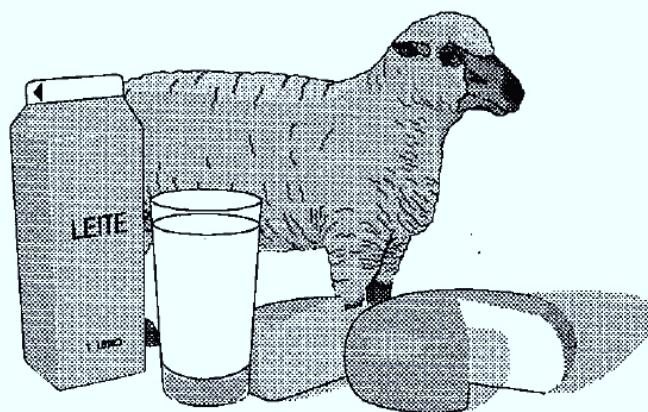


Métodos imunológicos na detecção de fraudes em leite e queijo de ovinos

Valdemar Rebelo Osório e Castro *



1. Introdução

A adulteração de leite de ovelha por leite de vaca é uma prática relativamente comum. Ela surge como consequência das flutuações sazonais na produção do leite ovino e também por motivos económicos, pois o leite bovino é mais barato. Certamente que o leite de ovelha falsificado vai ter alteradas as propriedades organolépticas do respectivo coágulo conduzindo à formação de queijos de inferior qualidade (Aranda *et al.*, 1988).

O desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção de fraudes na mistura de leites e nos respectivos queijos tem grande interesse para os países que produzem ou importam queijo de ovelha. Entre os procedimentos de análise já propostos, baseados na composição lipídica ou proteica contam-se os métodos electroforéticos, cromatográficos e imunológicos (Ramos e Juarez, 1984).

O grande número de publicações relacionadas com o assunto justifica uma revisão bibliográfica crítica como seguimento e complemento ao último estudo efectuado (Ramos e Juarez, 1984). Com esse objectivo pretendo discutir somente os métodos imunológicos utilizados nos últimos anos, na detecção das fraudes em leites e queijos, chamando a atenção para os aspectos fundamentais dos ensaios (imunogénio utilizado, objectivo técnico do método, natureza das amostras utilizadas, carácter qualitativo ou

quantitativo, sensibilidade e duração da análise). Os pormenores técnicos não serão considerados, pois podem ser examinados nas próprias publicações citadas e também em obras especializadas, como por exemplo o manual "Imunologia" (Ivan Roit, Jonathan Brostoff e David Male, 1989, Editora Manole, São Paulo, SP, Brasil).

2. Imunodifusão dupla

Durand *et al.* (1974) aplicaram o método da imunodifusão utilizando as imunoglobulinas e as lactoalbuminas dos leites bovino e caprino como imunogénios para preparar imunosoros aptos a detectarem aquelas proteínas em leites e queijos de ovelha. A determinação, baseada na intensidade da linha de precipitação obtida após difusão dos antígeno e anticorpo previamente aplicados a depressões produzidas em gel de agar (Fig. 1, adaptada de Levieux, D., 1977), torna possível obter informações semiquantitativas com uma sensibilidade relativamente alta (2,5% de leite de vaca na mistura).

Investigadores de vários países passaram a usar este procedimento na análise da adulteração de queijos. Foi possível aplicá-lo para o queijo Roquefort (Assenat, 1975), mesmo após um tempo de cura superior a 8 meses, conseguindo-se reconhecer níveis baixos de mistura de leite de vaca na ordem dos

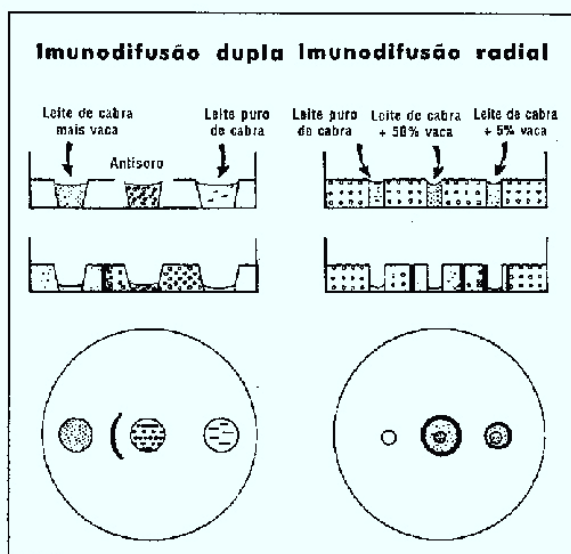


Figura 1 - A imunodifusão dupla e a imunodifusão radial na detecção de fraudes em leites. As placas com as várias depressões para analisar a adulteração de leite de cabra por leite de vaca são observadas em perfil na parte de cima. Na parte de baixo as mesmas placas vistas de cima para baixo permitem reconhecer as linhas de imunoprecipitação (imunodifusão dupla à esquerda, e imunodifusão radial à direita).

2.5%. Outros queijos de ovelha, particularmente os tradicionais de Itália (Carini e Busca, 1975), Espanha (Lorenzo, 1975) e Grécia (Kalatzopoulos, 1977), foram também analisados, com sucesso, para detectar misturas indesejáveis.

O inconveniente mais notório deste método, que o pode tornar inadequado ao fim em vista, está relacionado com a sensibilidade térmica das proteínas do soro. Desse modo, leite bovino previamente esterilizado, não é detectado na mistura de leites se forem utilizados os anticorpos preparados contra as imunoglobulinas e as lactoalbuminas. Por exemplo, a utilização do método a leite bovino esterilizado e ao respectivo queijo de vaca não fornece imunoprecipitação (Ramos, 1976).

3. Imunodifusão radial

Levieux (1977) preparou um novo anti-soro para analisar a pureza de leites de cabra e de ovelha. A IgG₁ (imunoglobulina G₁) de leite de vaca, proteína não sintetizada pela glândula mamária, serviu de imunogénio em cabras e ovelhas na obtenção do respectivo anti-soro que, purificado em colunas de cromatografia (Sephadex G-100 e DEAE celulose) (Levieux, 1974), pode ser aplicado nas técnicas da imunodifusão radial e da inibição da hemaglutinação.

No método da imunodifusão radial uma placa de

gel de agar é previamente impregnada com o anticorpo e o antígeno (amostra de leite ou extrato de queijo) é colocado em pequenas cavidades abertas nesse gel para se difundir durante 3-4 h (Fig. 1). O complexo antígeno-anticorpo vai sendo formado mantendo-se a princípio solúvel, mas precipitando depois, à medida que mais anticorpo é complexado. O diâmetro do anel, que é visualizado no gel, é proporcional à concentração do antígeno o que permite estabelecer curvas padrão para a determinação quantitativa de misturas de leite bovino com os de ovino e caprino. É grande a sensibilidade dessa análise podendo-se chegar à detecção de 1% de leite de vaca na mistura. Contudo a sua aplicação a queijos é mais problemática exigindo correcções.

A imunodifusão radial dupla, tecnicamente similar ao método agora descrito, foi desenvolvida (Gombcz & colaboradores, 1981) para detectar leite de vaca em leite de cabra utilizando anti-soro comercial para caseína bovina. O limite de detecção foi de 5% de leite bovino na mistura e a aplicação a queijos também se mostrou promissora.

4. Inibição da hemaglutinação

Neste método, glóbulos vermelhos de galinha são normalmente sensibilizados com IgG bovino podendo, assim, ser facilmente aglutinados com anti-soro específico, mesmo em altas diluições. Contudo, na presença de leite de ovelha ou cabra adulterados com leite de vaca o anti-soro é neutralizado pelo antígeno bovino inibindo assim a aglutinação. Esta análise utiliza uma placa com pequenas cavidades (96, normalmente) dispostas em 8 séries de 12. Nas cavidades da 1ª sequência, por exemplo, é colocado o anti-soro em 10 diluições sucessivas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ... 1/1024) sendo os controlos positivo (hemaglutinação presente) e negativo (ausência de hemaglutinação) preparados, respectivamente, na 11ª e na 12ª séries, sendo as outras cavidades utilizadas para os ensaios imunológicos com as amostras de leite e queijo adulterados. O limite de detecção é grande (1% para os leites e 4% para os queijos). O tempo de análise é menor (cerca de 30 minutos) do que no método da imunodifusão radial sendo, contudo, a determinação muito mais delicada (Levieux, 1978 e 1980). As figuras 2 e 3 ilustram este procedimento.

5. Imunoelectroforese (em foguete)

A imunoelectroforese foi utilizada para a determinação de leite de vaca misturado a leite de cabra (Radford, et al., 1981). O processo passa-se em uma placa de gel de agarose impregnada com anti-soro obtido

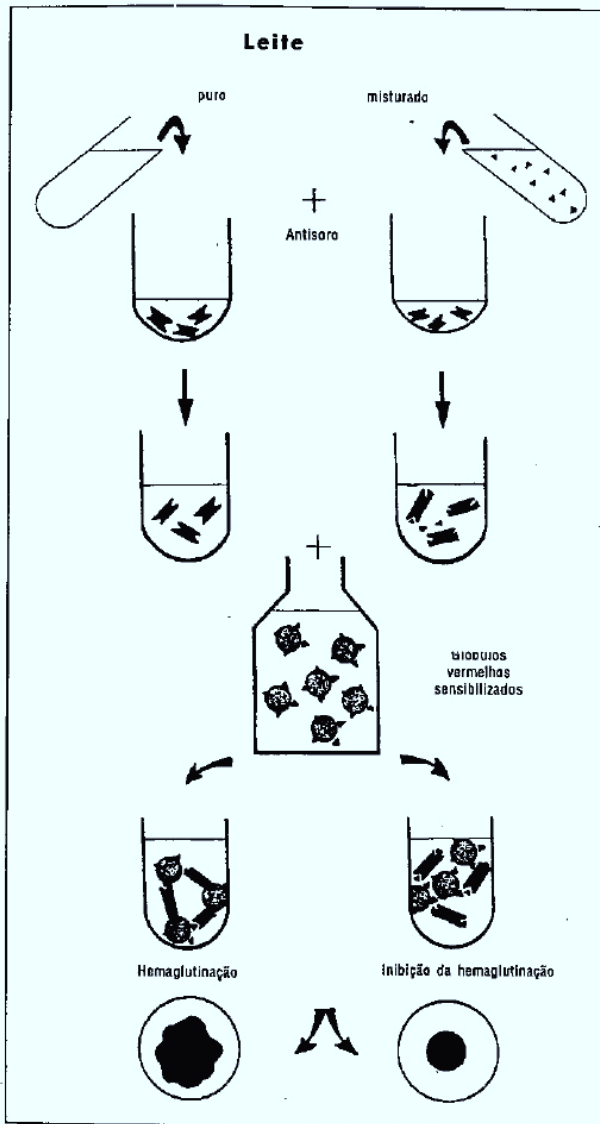


Figura 2 - O princípio da inibição da hemaglutinação na detecção de fraudes em leites. Este esquema mostra como os antígenos correspondentes ao leite estranho ao se complexarem com os respectivos anti-corpos impedem que os glóbulos vermelhos previamente sensibilizados sofram a hemaglutinação. (Adaptação de Levieux, 1980).

de cabra, utilizando como imunogénio leite magro de vaca. As amostras de leite de cabra adulterado são aplicadas em uma das extremidades do gel e submetidas ao campo eléctrico pelo menos durante 3 h, a um pH adequado, a fim de permitir a mobilidade electroforética dos antígenos e assegurar a imobilização dos anticorpos impregnados. Com isso a precipitina formada durante o ensaio surge em forma de foguete cuja altura é proporcional à concentração do antígeno e portanto à concentração do leite de vaca na mistura.

É um método que permite estabelecer curvas padrão com amostras de leite caprino contendo, em mistura, de 1 a 10% de leite bovino. A sensibilidade

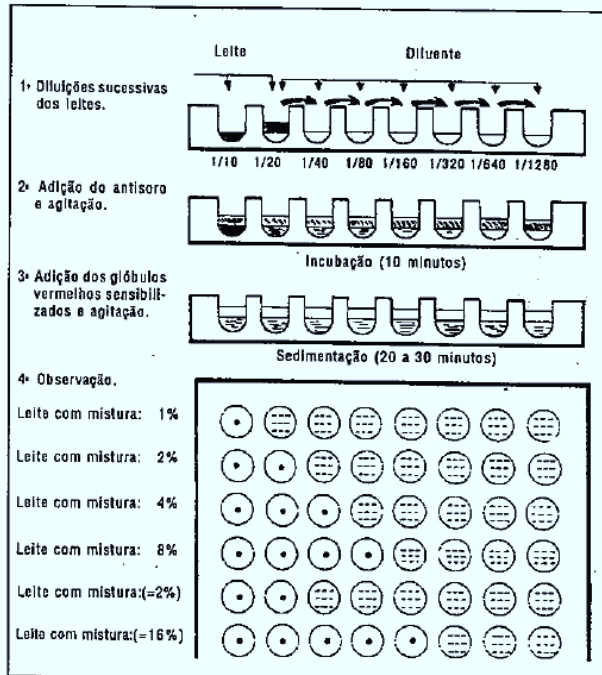


Figura 3 - O princípio da inibição da hemaglutinação na detecção de fraudes em leites. Este esquema mostra os vários passos da prova imunológica conduzida nas várias cavidades da placa. A 4ª etapa permite observar o resultado final da análise, com a placa vista de cima para baixo, para leites com percentagens diferentes mas conhecidas de leite estranho (cavidades padronizadas) e para dois leites em análise. (Adaptação de Levieux, 1980)

é pois muito boa, sendo quase ausentes as reacções imunológicas cruzadas com o anti-soro obtido da cabra, o que não aconteceria se fosse usado anti-soro obtido de outro mamífero que não a cabra. Por outro lado o limite de detecção utilizando anti-soro obtido de coelho é somente de 5%.

De facto todos os métodos imunológicos têm como principal problema a resolver a preparação de um bom anticorpo para detectar antígenos específicos. Neste trabalho houve um avanço nesse sentido pois, através da imunização de caprinos com leite magro de vaca, foi possível obter um anti-soro específico para este leite com um mínimo de operações laboratoriais.

Este método é adequado também para o caso de leites pasteurizados, pois os resultados são similares aos obtidos com leites crus. Já para leites esterilizados, provavelmente, haverá problemas, devido à desnaturação térmica das proteínas do soro, que as tornam insensíveis aos respectivos anticorpos. O método é muito mais simples do que os processos imunológicos até agora citados, sendo possível aumentar-lhe a sensibilidade, controlando adequadamente a relação antígeno-anticorpo. É de se esperar também que, relacionando a área ocupada pela precipitina com a concentração do leite caprino na mistura e não simplesmente a

altura do "foguet" os aspectos quantitativos sejam mais rigorosos.

6. Imunoelectroforese (em contra corrente)

Esta modalidade analítica foi aplicada à avaliação da qualidade de queijos de ovelha e de cabra (Elbertzhagen e Wenzel, 1982), utilizando a imunoelectroforese anteriormente descrita (Clarke e Freeman, 1967). São utilizadas placas de gel de agar impregnadas de tampão, a um pH adequado para conferir carga positiva ao anticorpo e negativa ao antigénio. O anticorpo é aplicado em uma extremidade do gel e o antigénio no extremo oposto. A diferença de potencial estabelecida permite a migração das citadas amostras em sentidos opostos até acontecer o encontro e a respectiva precipitação. Há uma semelhança com a técnica da imunodifusão mas a sensibilidade aumenta (10 a 20 vezes) particularmente se a revelação é feita com sal de prata.

Na investigação de caseína bovina em queijos de ovelha e de cabra, por este método, foi utilizado anti-soro contra essa proteína obtido a partir do coelho correctamente imunizado. Foi possível detectar nesses queijos níveis muito baixos de caseína bovina na ordem dos 0,1 a 0,2%. Além da grande sensibilidade obtida há que referir também a sua aplicabilidade para queijos adulterados com leite de vaca esterilizado, uma vez que a desnaturação da caseína não causa inibição imunológica com o respectivo anticorpo.

7. Imunoadsorção com enzima ligada (mancha imunológica)

Quase todos os métodos até agora discutidos baseiam-se em reacções de precipitação entre proteínas do leite bovino com os respectivos anticorpos. As proteínas do soro não são termoestáveis o que limita a sua utilização para leites crus ou moderadamente aquecidos. Por outro lado a caseína, embora resistente ao calor, tem fraco poder antigénico, o que obriga a utilizar concentrações elevadas de antisoro para a sua detecção.

O método da mancha imunológica, no procedimento a seguir descrito, envolve também um anticorpo com afinidade pela caseína bovina mas em concentrações menores do que as utilizadas pelos outros métodos até aqui tratados. Para isso, a sua preparação exige uma imunoadsorção em colunas de cromatografia por afinidade em que caseína ovina imobilizada na sepharose 4B permite a remoção de anticorpos capazes de fornecer reacções cruzadas nos ensaios

visando à investigação das adulterações (Aranda et al., 1988).

Na análise de leite ou queijo de ovelha adulterado por leite de vaca as amostras são aplicadas em volumes muito baixos (1µl), sobre uma membrana de nitrocelulose de forma a obter-se uma pequena mancha em círculo para permitir a adsorção do material. A adição posterior do anti-soro contra a caseína bovina vai permitir a interacção antigénio-anticorpo nas amostras com caseína de leite de vaca. A lavagem exhaustiva da película de nitrocelulose permite eliminar todos os componentes solúveis e reter o complexo antigénio-anticorpo, cuja concentração é indirectamente determinada pela aplicação de um anticorpo contra IgG associado a uma peroxidase. Após lavagens exaustivas a enzima retida junto com o anticorpo ligado é detectada utilizando o 4-cloro-1-naftol como substrato, cuja transformação é reconhecida pela cor lilás nos locais contendo caseína bovina.

É um método mais sensível do que as técnicas de imunoprecipitação em gel tendo, os autores que o propuseram, detectado de 0,1 a 10% de leite bovino em mistura com leite de ovinos, não apresentando o controlo, constituído por leite de ovelha puro, qualquer reacção colorimétrica. A análise de leites pasteurizados ou esterilizados conduz aos mesmos resultados que são obtidos com leite cru.

A detecção que este método refere é ainda de natureza semiquantitativa, não tendo havido por parte dos autores a preocupação de medir a intensidade do cromóforo visualizado nas películas de nitrocelulose. Provavelmente é difícil essa determinação o que vai requerer um estudo mais elaborado, plenamente justificável tendo em vista que o método é simples, económico e rápido.

A aplicação à determinação do grau de adulteração de queijos de ovinos por leite de vaca em diferentes percentuais foi realizada para queijos Manchego (de ovelha) em mistura com queijos Cheddar (de vaca). A detecção, embora possível, não é nem semiquantitativa devido à dificuldade de dispersão dos dois tipos de queijo. Também neste aspecto este método imunológico exige uma análise mais aprofundada.

Este método já é muito semelhante, em certos aspectos, aos métodos ELISA, descritos a seguir, que são muito mais práticos, quantitativos, e semi-automáticos permitindo a análise simultânea de muitas amostras em placas adequadas para as provas imunológicas.

8. Imunoadsorção com enzima ligada (ELISA indirecto)

Neste método apresentado recentemente (Rodriguez et al., 1990) na aplicação à elucidação quantitativa da adulteração de leites e queijos de ovinos por leite bovino, o anti-soro é preparado em coelhos imunizados

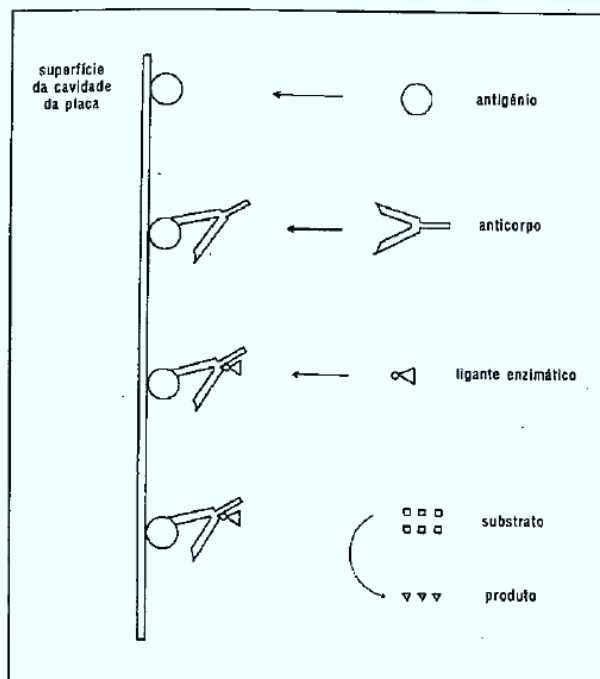


Figura 4 - As várias reacções fundamentais do método ELISA (indirecto). Em primeiro lugar o antigénio é adicionado à placa e em seguida são colocados os reagentes mencionados na figura, na ordem indicada de cima para baixo. Nas restantes versões da técnica do ELISA o procedimento é similar com as modificações descritas no texto.

contra caseína bovina sendo depois purificado por imunoadsorção em colunas de afinidade de Sepharose 4B. A biotilação (incorporação de biotina ao anticorpo) seguida de incubação longa com caseínas de ovinos e de caprinos, num processo denominado bloqueamento, permite obter o anti-soro específico para caseína bovina e minimizar os processos morosos, caros e delicados das cromatografias de afinidade contendo ligados os antigénios heterólogos. Com este procedimento os autores acima referidos conseguiram melhorar o processo de preparação de anticorpos com vista às aplicações desejadas.

Uma outra novidade é a introdução da técnica semi-automática de imunoadsorção com enzima ligada (ELISA) à detecção de fraudes em leites e queijos. Abstraindo os detalhes técnicos o método ELISA é realizado em microplacas apropriadas, contendo 96 cavidades, onde o anticorpo biotilado é adicionado, após prévia adsorção das caseínas antigénicas eventualmente contidas nas amostras a analisar. O complexo anticorpo-antigénio imobilizado nas cavidades é, então, detectado pela adição de extravidina-peroxidase, que tem uma forte afinidade pela biotina do anticorpo, através da Avidina (uma proteína da clara do ovo). Finalmente a adição do substrato específico (2,2'-azidobis-3-etilbenzotiazolino) permite determinar a quantidade de enzima ligada, pela medida espectrofotométrica a 405nm do cromóforo

verde produzido. Todo este procedimento demora mais de 3h, mas permite a análise simultânea de várias amostras num processo que utiliza um instrumento adequado para torná-lo quase inteiramente automático.

Na análise de misturas de leites o método foi aplicado com pleno sucesso, permitindo determinar a inclusão de 1 a 50% de leite bovino em leite ovino. A curva padrão determinada mostra-se linear, particularmente a partir de 10% de leite de vaca na mistura. Os resultados com leite bovino pasteurizado, esterilizado e tratado a temperaturas muito elevadas (leite UHT) são essencialmente semelhantes aos obtidos com leite cru o que confirma, mais uma vez, não ser a imunoreactividade das caseínas de leite de vaca afectada pelo aquecimento. Também na análise dos queijos o método é adequado, tendo sido possível detectar queijo bovino quando em mistura com queijo caprino nos teores compreendidos entre 1 e 50%. Neste caso, há também nestes limites, uma proporcionalidade entre a densidade óptica a 405 nm e o percentual de queijo bovino na mistura.

Outras determinações, baseadas também no ELISA indirecto, foram aplicadas na detecção de leite caprino em misturas de leites e em queijos (Rodrigues, et al, 1991) e na análise de misturas de leite bovino em leite de ovelha (Garcia et al, 1990), apresentando, em ambos os casos, bom nível de sensibilidade. A Figura 4 ilustra a sequência de reacções desta prova imunológica.

9. Imunoadsorção com enzima ligada (ELISA "sandwich")

O método ELISA em "sandwich" foi aplicado na determinação quantitativa de leite caprino em leite ovino (Garcia *et al.*, 1993) através de uma metodologia parecida com a apresentada anteriormente. Neste caso os anticorpos foram produzidos em coelhos imunizados com proteínas de soro de leite de cabra e depois purificados por cromatografia de afinidade para eliminar a antigenicidade contra proteínas de soro de leite bovino e ovino. Os anticorpos foram então biotilados para posterior utilização nas provas imunológicas.

Este método difere do anterior no que diz respeito à técnica empregada na preparação do anticorpo, substituindo o processo de bloqueamento pela cromatografia de imunoadsorção que é mais trabalhosa e dispendiosa. A análise imunológica também é algo diferente da descrita anteriormente, embora em linhas gerais haja semelhanças. As diferenças fundamentais residem no facto da amostra a analisar ser adicionada à placa do ensaio imunológico após prévia imobilização do anticorpo de captura (não biotilado) e só então é que o anticorpo biotilado entra em contacto com o antigénio. Desse modo surge uma "sandwich" em

que o antígeno ocupa a posição central do conjunto imobilizado. A enzima (ExtraAvidinaperoxidase) adicionada depois, liga-se fortemente ao anticorpo biotilado, através da alta afinidade existente entre a biotina do anticorpo e a Avidina associada à peroxidase. A catálise da transformação do substrato (2,2' - azinobis-3-etileno-benzotiazolino), que é adicionado por último, fornece um cromóforo que é detectado espectrofotometricamente a 405 nm. A análise demora mais de 5 horas mas, pode ser conduzida com várias amostras em simultâneo e de um modo semiautomático.

Este método permite detectar leite caprino em leite ovino, quantitativamente, em teores compreendidos entre 0.5 e 100%. É extraordinária a sensibilidade da análise nos limites compreendidos entre 0.5 e 20% onde se devem situar os teores normais das fraudes. Com amostras de leite caprino pasteurizado a resposta imunológica é praticamente igual à do leite cru o que não acontece com o leite esterilizado em que os respectivos valores são 30% menores do que os do leite cru. Assim sendo, havendo mistura de leite caprino esterilizado a leite ovino, aquele vai ser detectado em menor percentagem.

Esta mesma técnica foi também recentemente utilizada (Levieux, e Venien, 1994) para detectar misturas de leite de vaca em leite de ovelha e cabra. Neste caso porém, foram aplicados anticorpos monoclonais contra o antígeno β -lactoglobulina bovino.

É a primeira vez que um anticorpo monoclonal é produzido e utilizado nestas provas imunológicas. A escolha da β -lactoglobulina como imunogénio apresenta-se como vantajosa em relação às outras proteínas do leite pois é particularmente resistente à proteólise que ocorre durante a maturação dos queijos (Amigo *et al.*, 1991). Além disso a sua concentração no leite não oscila, significativamente, por alterações nas pastagens ou por condições patológicas (Larson e Kendall, 1957).

A preparação de anticorpos policlonais, específicos para a β -lactoglobulina bovina, não é fácil, pois a estrutura das β -lactoglobulinas dos ruminantes é muito semelhante. Daí os autores terem optado em utilizar a técnica do hibridoma e através de adequada selecção e clonagem conseguiram produzir anticorpos contra β -lactoglobulina bovina em grandes quantidades, sem necessidade de recorrer às demoradas e dispendiosas purificações por cromatografia de afinidade.

Os anticorpos preparados (MAb 17 e MAb 102) foram utilizados no processo ELISA ("sandwich"), servindo o MAb 17 como anticorpo de captura e o MAb 102, após conjugação à peroxidase, como detector de alta afinidade da B-Ig previamente fixada ao MAb 17. O substrato utilizado é o ortofenilenodiamina cuja transformação catalisada pela peroxidase fornece um cromóforo medido a 490 nm.

Os autores optimizaram as condições para uma boa prova imunológica que se revelou altamente específica

sensível e reprodutível. Na aplicação à análise de misturas de leite bovino em leites ovino e caprino é possível chegar ao limiar de 0,5% de adulteração o que é muito bom pois os níveis da falsificação são certamente superiores. O método não foi utilizado na análise de adulteração de queijos mas é de se esperar que seja muito efectivo, ainda mais tendo em conta que a β -lactoglobulina bovina é resistente à proteólise da maturação como foi já referido. Embora as provas imunológicas sejam lentas como as de todos os processos ELISA há que não esquecer o grande número de amostras que podem ser simultaneamente analisadas.

10. Imunoadsorção com enzima ligada (ELISA competitivo)

O método ELISA competitivo utilizando um anticorpo monoespecífico para a α_{s1} -caseína bovina foi aplicado na determinação de leite bovino em leite e queijo de ovinos (Rolland *et al.*, 1993). Estes investigadores conseguiram preparar um anticorpo monoespecífico para a α_{s1} -caseína bovina, portanto sem possibilidade de formação de complexos antígeno-anticorpo com proteínas homólogas de ovinos ou caprinos. Isso só foi possível porque a sequência primária da α_{s1} -caseína bovina é diferente da da ovina. Particularmente o fragmento correspondente aos resíduos dos aminoácidos desde o 141 a 148 existente na α_{s1} -caseína bovina não faz parte da α_{s1} -caseína ovina e o resíduo 148 é diferente na α_{s1} -caseína caprina (Brignon *et al.*, 1989).

O peptídeo correspondente à sequência 140-149 da α_{s1} -caseína bovina (QELAYFYPEL), sintetizado em fase sólida (Calas *et al.*, 1985), foi directamente utilizado como imunogénio na produção de anticorpos policlonais monoespecíficos em coelhos. O anticorpo obtido revelou-se com actividade imunogénica relativamente ao peptídeo ligado à resina da fase sólida e relativamente à própria α_{s1} -caseína bovina, não reconhecendo imunologicamente as proteínas homólogas ovinas ou caprinas. Assim, de um modo extremamente simples foi possível preparar um anti-soro monoespecífico sem necessidade das cromatografias de imunoadsorção dispendiosas e lentas normalmente utilizadas por outros investigadores.

A aplicação à prova imunológica deste ELISA difere um pouco, no seu procedimento, do apresentado nos métodos ELISA anteriormente mencionados. No processo agora em consideração, as cavidades das placas de ensaio são previamente sensibilizadas com α_{s1} -caseína bovina e após completa saturação com gelatina e hidrolisado de gelatina dos locais não ocupados, as microplacas são conservadas a -20 °C até posterior utilização. As amostras a analisar, uma vez devidamente preparadas, são adicionadas às microplacas nas respectivas cavidades

juntamente com o anti-soro total de coelho previamente preparado e deixadas incubar durante a noite. Estabelece-se então uma competição entre o antigénio adsorvido previamente nas cavidades e o próprio antigénio da amostra (se o houver evidentemente) pelo anticorpo que lhe é específico. Após essa longa incubação e lavagens sucessivas é adicionado anti-IgG marcado com fosfatase alcalina. O substrato, paranitrofenilfosfato, detecta esta enzima fornecendo paranitrofenol, que é medido espectrofotometricamente a 405 nm. Deste modo o antigénio da amostra pode ser quantificado pela sua capacidade de inibir a ligação dos anticorpos ao antigénio previamente adsorvido nas cavidades. O processo é demorado, mas como nas outras versões do ELISA permite examinar várias amostras simultaneamente e de um modo semiautomático.

Pela descrição sumária do ELISA competitivo compreende-se que valores altos de densidade óptica a 405 nm são obtidos para pequenas percentagens de leite bovino nas misturas de leites. O método apresenta-se altamente sensível permitindo uma curva padrão linear desde 0.125 a 64% (v/v) correspondente a percentagens de leite bovino em leite ovino, achando-se o leite 100% bovino, testado nas mesmas condições experimentais, perfeitamente na linha recta da calibração. Em relação aos queijos de ovelha (Roquefort) preparados a partir de leite de ovinos misturado com leite de vaca, a calibração é também rigorosamente linear, nos limites entre 0.5% a 25% (v/v), não sendo alterada pelo tratamento térmico do leite (115 °C, 15 min) nem pelo tempo de maturação do queijo, até 8 meses.

Este método foi apresentado à Comissão das Comunidades Europeias, Direcção Geral de Agricultura, VI-D-1, Produtos Lácteos, em 08 de Maio de 1992. Considerando a sua sensibilidade, especificidade, facilidade de execução, economia de instrumentação sofisticada, tem grandes hipóteses de vir a substituir o método da isoelectrofocalização (Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 20.03.1992 nº 174/23-32) como método oficial da Comunidade Europeia na análise da adulteração de leites e queijos de ovelha com o de outras espécies.

11. Conclusões finais

Na evolução da metodologia para a detecção de fraudes em leites e queijos conseguiu-se chegar a um método semiautomático, o método ELISA, (nas suas várias modalidades), que se constitui numa técnica robusta, económica, sensível e de rápida operacionalidade. Permite também tratar muitas amostras em simultâneo, em placa, de um modo fácil e com economia de reagentes, pois as quantidades utilizadas (de anticorpos, particularmente) são muito pequenas, ao contrário do que acontece nos métodos mais tradicionais.

Referências bibliográficas

- Amigo, L., Ramos, M., Martin-Alvarez, P. J. & Barbosa, M. (1991). "Effect of the technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheese". *Journal of Dairy Science*, 74: 1482-1490.
- Aranda, P.; Oria, R. & Calvo, M. (1988) "Detection of cow's milk in ewes' milk and cheese by an immunodotting method". *Journal of Dairy Research*, 55:121-124.
- Assenat, L. (1975) "De l'adaptation du procédé d'immunodiffusion à l'identification des adultérations du lait de brebis et du fromage de Roquefort". *Réunion Laboratoire*, Tours.
- Brignon, G.; Mahe, M.F.; Grosclande, F. & Ribadeau-Dumas, B. (1989) "Sequence of caprine α_{s1} -casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, α_{s1} -CnA, B and C. Protein sequences and Data Analysis", 2:181-188.
- Calas, B.; Mery, J.; Parello, S. & Cave A. (1985) "Solid-phase Synthesis using a new polyacrylic resin. synthesis of the fragment 14-21 of the amino acid sequence of histone H4". *Tetrahedron*, 41: 5331-5339.
- Carini, S. & Busca, M. (1975) "Riconoscimento del latte vaccino del latte e neiformaggi di pecora". *Il Latte*, 3: 3-5.
- Clarke, H.G.M. & Freeman, T.A. (1967) "A quantitative immunoelectrophoresis method". *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 14: 503-509.
- Durand, M.; Meusnier, M.; Delahaje, J. & Prunet, P. (1974) "Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gelose". *Boll.Ac.Vet.*, 47: 247-258.
- Elbertzhagen, H. & Wenzel, E. (1982) "Detection of bovine milk in sheeps milk cheese by means of immunoelectrophoresis". *Z. Lebensm. Unters Forssh.*, 175: 15-16.
- Garcia, T.; Martin, R.; Rodriguez, E.; Morales, P.; Hernandez, E. & Sanz, B. (1990) "Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay". *Journal Dairy Sci.*, 73: 1489-1493.
- Garcia, T.; Martin, R.; Morales, P.; Gonzalez, I.; Sanz, B. & Hernandez, P. (1993) "Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk". *Milch Wissenschaft*, 48(10): 563-566.
- Gombcz, E.; Hellwing, E. & Petuely, F. (1981) "Immunological detection of cow's milk casein in ewe's milk cheese". *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 172: 178-181.
- Kalatzopoulos, G. (1977) "Method for determining the kind of milk used for cheese or yogurt-making". *Hemica Hronica*, 42(1): 41-45.
- Larson, B. L. & Kendall, K. A., (1957). "Protein production in the bovine. Daily production of the specific milk proteins during the lactation period". *Journal of Dairy Science* 40: 377-386.
- Levieux, D. (1974) "Immunoglobulines bovines et brucellose.(I) Purification des immunoglobulines et préparation de leurs antisérums spécifiques". *Ann.Rech. Vet.*, 5: 329-342.
- Levieux, D. (1977). "New technique for detecting adulteration of goat's and ewe's milk". *Dossiers de l'Elevage*, 2: 37-46.
- Levieux, D. (1978) "Detection immunologique des mélanges de laits de diverses espèces". *XX Congrès Intern. de Laiterie*, Paris 15 ST.
- Levieux, D. (1980) "The development of a rapid and sensitive method based on hemagglutination inhibition, for the measurement of cow milk goat milk". *Ann. Rech.Vet.*, 11(2): 151-156.
- Levieux, D. & Venien, A., (1994). "Rapid, sensitive two site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies". *Journal of Dairy Research* 61: 91-99.

- Lorenzo, J. (1975) "Detección del fraude en la leche de oveja". *Alimentaria*, 65: 31-33.
- Radford, D.V.; Tchan, Y.T. & Mc Phillips, J. (1981) "Detection of cow's in goat's milk by immunoelectrophoresis". *Australian Journal of Dairy Technology*, 35: 114-146.
- Ramos, M. (1976) "Aplicación del método inmunológico a la detección de leche de vaca en queso manchego." *Rev. Esp. de Lechería*, 101: 147-154.
- Ramos, M & Juárez, M. (1984) "Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cows', ewes' and goats' milk". *IDF Bulletin* 181.
- Rodríguez, E.; Martín, R.; García, T.; Hernández, P.E. & Sanz, B. (1990) "Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzymatic-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Journal of Dairy Research*, 57: 197-205.
- Rodríguez, E.; Martín, R.; García, T.; Azcona, J.I.; Sanz, B. & Hernández, P.E. (1991) Indirect ELISA for detection of goats' milk in ewes' milk and cheese. *Int. J. Food Science Technol.*, 26: 457-465.
- Rolland, M. P., Bitri, L. & Besançon, P. (1993). "Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine aSI - casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese". *Journal of Dairy Research* 60: 413-420.

*Bioquímico, Professor Coordenador da ESACB