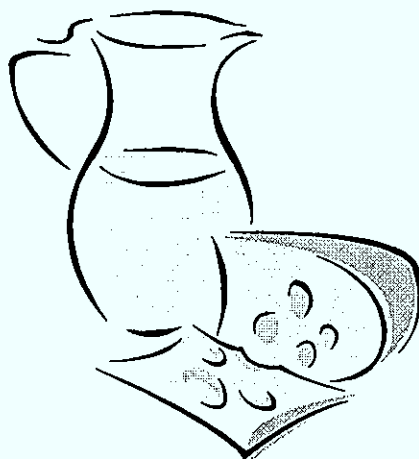


# A Imunonefelometria em Micropartículas na Determinação de Caseínas de Leites e Queijos

Valdemar Rebelo Osório e Castro\*



## 1. Introdução

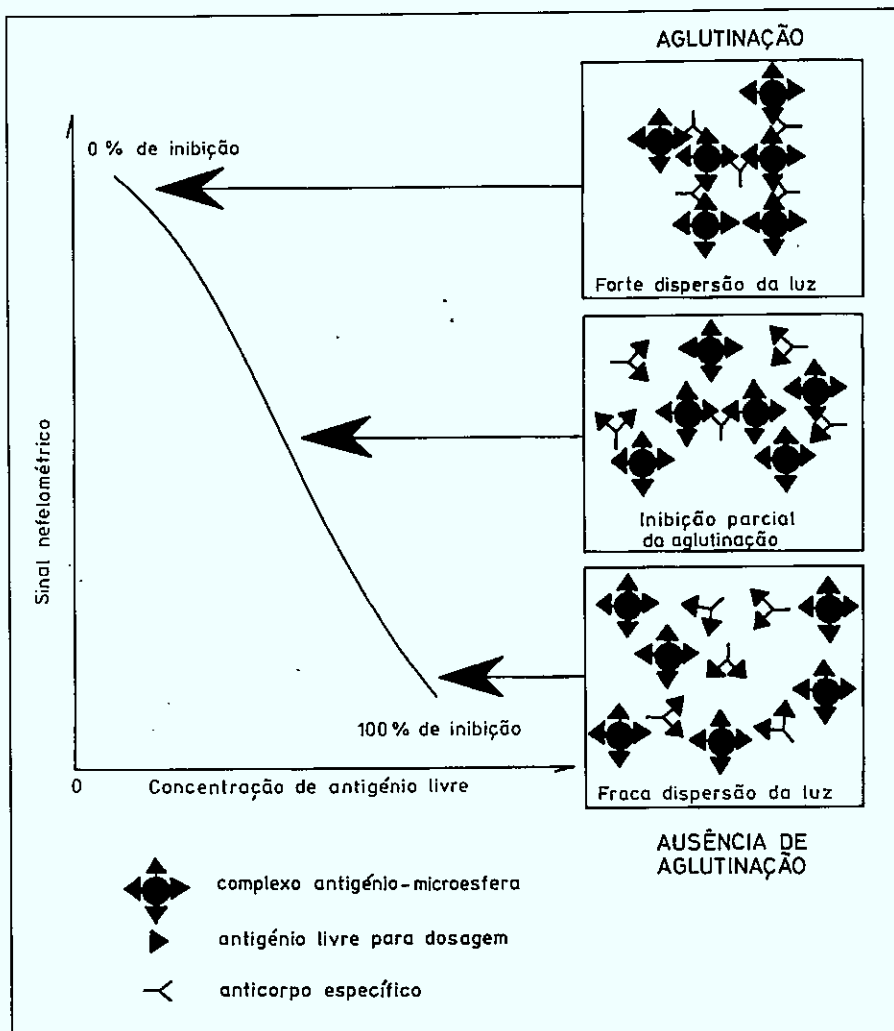
A determinação do conteúdo proteico em leites é uma prática comum dada a importância de que se reveste para programar a transformação do leite nos seus respectivos derivados (queijos, iogurtes, etc.). Alguns dos métodos que têm sido utilizados fornecem como informação o conteúdo proteico total sendo por isso bastante limitativos. É o caso do método de Kjeldahl (que exige destruição da amostra) e do método da espectrometria do infravermelho (Marth, 1978). Há outros métodos, porém, como a electroforese em gel de poliacrilamida (McLean *et al.*, 1982) e as técnicas cromatográficas mais modernas como o HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) (Bican e Blanc, 1982), bem assim como o FPLC (rápida cromatografia líquida de proteínas) (Andrews *et al.*, 1985) que além de serem muito sensíveis permitem conhecer rapidamente o conteúdo individual das várias proteínas. Contudo não têm sido utilizados rotineiramente na indústria leiteira, provavelmente, além de outras razões, por exigirem instrumentação sofisticada e de elevado custo.

Nas últimas décadas, técnicas imunológicas têm também merecido uma atenção muito cuidadosa no sentido de serem aplicadas a leites e seus derivados. Têm-se mostrado muito úteis, pois além da sua sensibilidade, especificidade e rapidez exigem instrumentação mais

acessível à maioria dos laboratórios. É o caso da imunoelectroforese (Hanson e Mansson, 1961; Hanson e Johansson, 1970), da técnica radioimunológica (Beck e Tucker, 1977), do ELISA (imunoenzyme-linked immunosorbent assay) (Lefier e Colin, 1982; Rittemburg *et al.*, 1984) e da imunonefelometria convencional.

A imunonefelometria clássica constitui-se num método imunoenzimático baseado na quantificação nefelométrica da reação antígeno-anticorpo. Embora seja uma técnica de fácil manuseio e tenha sido utilizada amplamente para a análise de proteínas em vários sistemas biológicos (Sieber e Cross, 1976; Schliep e Felgenhauer, 1978; El Hamoui *et al.*, 1982), apresenta um baixo índice de detecção se a compararmos com os métodos, também imunológicos, que utilizam marcadores, como os aplicados em radioimunologia e em imunoenzimologia. Além disso exige pré-tratamento das amostras.

Mais recentemente foi desenvolvida a técnica da imunonefelometria em micropartículas por investigadores do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina de Vandoeuvre-les-Nancy em França e do Laboratório de Bioquímica Aplicada da Faculdade de Ciências da mesma cidade. As aplicações dessa técnica à análise biomédica e de proteínas de leite têm-se sucedido a ritmo crescente nos últimos anos pois é superior à imunonefelometria convencional, pelas características que lhe têm sido referidas (sensibilidade, reproductibilidade, facilidade de execução, rapidez e ausência de qualquer pré-tratamento das amostras).



**Figura 1 - Sinal Nefelométrico dos Conjugados Micropartículas-Antígenios.**

A imunoaglutinação dos conjugados micropartículas-antígenios pelo respectivo anticorpo produz uma forte dispersão luminosa que é inibida na presença de antígeno livre no meio de reação (adaptação de gráfico obtido no Laboratório de Bioquímica Aplicada, Faculdade de Ciências, Vandoeuvre-les-Nancy, França).

A descrição sumária dos fundamentos dessa metodologia e a apresentação de algumas aplicações à determinação de caseínas de leites e de queijos constituem o objectivo deste trabalho de divulgação.

## 2. A imunonefelometria em micropartículas

As micropartículas utilizadas neste método constituem a fase sólida microesférica especialmente sintetizada para permitir um suporte adequado para a ligação de um dado antígeno. Tais microesferas hidrofílicas e polifuncionais são normalmente obtidas a partir de monómeros de acrilato cuja copolimerização sob a acção da irradiação gama fornece partículas de diâmetro predeterminado, condicionado às condições de síntese (concentração total dos monómeros, concentrações relativas de cada monómero e do surfactante), aptas à ligação de antígenos e à posterior utilização em ensaios imunonefelométricos (Montagne *et al.*, 1980;

Duheile *et al.*, 1982; Marchand *et al.*, 1992). Podem conservar-se durante vários anos a 4°C, em suspensões monodispersas, na presença de hidroquinona ou de azida de sódio, e serem utilizadas sempre que necessário.

A ligação de antígenos às microesferas é extremamente simples, bastando misturar a proteína antigénica com as micropartículas durante aproximadamente 2h, à temperatura ambiente, e cerca de 18h a 4°C. As ligações imínicas que se estabelecem entre carbonilos aldeídicos da fase sólida e grupos amínicos da superfície proteica garantem a formação de partículas com antígeno superficial, perfeitamente estáveis a 4°C na presença de azida ou, em muitos casos, podendo ser conservadas a -20°C.

A imunoreactividade da proteína ligada às micropartículas pode ser devidamente determinada através de um nefelómetro adaptado com a respectiva microcuveta (Nephelia N600, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, FR). Os conjugados proteína-micropartícula não aglutinam entre si a não ser que entrem em contacto com o anticorpo específico para a proteína. Neste caso há uma imunoaglutinação, pois estabelecem-se pontes de ligação entre o anticorpo e os referidos conjugados. Surgem assim agregados que causam o espalhamento da luz incidente (laser He-Ne-632,8nm-2mW) na microcuveta, cuja intensidade de luz reflectida é medida sob um ângulo de 10° com um diodo sensível à radiação (El Bari *et al.*, 1991).

Havendo antígeno livre no meio de reação é possível inibir a imunoaglutinação como consequência da competição dos dois antígenos (livre e combinado) pelo mesmo anticorpo. O nefelómetro acusa tal inibição, pois é observada uma diminuição da intensidade da luz dispersa, que está relacionada com a concentração de antígeno livre.

A figura 1 mostra claramente o que acaba de ser descrito. O sinal nefelométrico das micropartículas conjugadas ao antígeno depende da concentração do antígeno adicionado, mantendo constante a concentração do anticorpo específico, como é óbvio. Quando não há antígeno livre as micropartículas estão todas associadas através das pontes moleculares fornecidas pelo anticorpo, sendo o tamanho desses conjugados suficientemente grande para dispersar maximamente a luz incidente. Contudo, à medida que a concentração do antígeno livre aumenta, cresce também a competição pelo anticorpo, acabando por impedir que este participe na aglutinação das várias micropartículas cuja dimensão, no estado livre, é insuficiente para dispersar a luz,

podendo-se assim atingir um sinal nefelométrico muito baixo correspondente a 100% de inibição. A concentração do antigénio necessária para produzir 50% de inibição é um valor a considerar na quantificação das análises, embora uma curva padrão seja necessária para isso.

Também na prática este método é extremamente simples. É muito fácil de ser executado, exigindo simplesmente três pipetagens feitas directamente na microcuveta do nefelómetro, a que se segue um tempo de incubação (de 30 minutos a 1h), não havendo necessidade de lavagens, nem separação de fases, o que permite facilmente a análise de, aproximadamente, 360 amostras por hora e, sendo dotado de grande sensibilidade, torna possível detectar alguns femtomoles por litro. Por permitir a análise de amostras altamente diluídas e, com isso, eliminar, ou pelo menos diminuir drasticamente, a possibilidade de interferências, dispensa tratamentos preliminares da amostra.

### 3. As caseínas do leite bovino e sua quantificação por imunonefelometria em micropartículas

As caseínas são as fosfoproteínas que precipitam a pH = 4,6 a 20°C após prévia separação da gordura. São identificadas de acordo com a homologia das suas estruturas primárias (sequência de aminoácidos) nas seguintes famílias:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e K caseínas. Membros individuais dessas famílias podem ainda ser identificados utilizando técnicas de electroforese em gel.

As  $\alpha_{s1}$  caseínas ( $\alpha_{s1}$ -CN) consistem em duas cadeias, cada uma com 199 resíduos de aminoácidos, diferentemente fosforiladas, havendo cinco variantes genéticas (A, B, C D e E) em ordem decrescente das mobilidades electroforéticas relativas em géis alcalinos contendo uréia (Peterson, 1963). As  $\alpha_{s2}$ -CN têm uma estrutura primária com 207 aminoácidos tendo sido reconhecidas quatro variantes genéticas (A, B, C e D) (Grosclaude *et al.* 1979). A  $\beta$  caseína ( $\beta$ -CN) contém 209 aminoácidos (Ribadeau-Dumas *et al.*, 1972) e fornece as  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$  caseínas por proteólise na presença da plasmina que é uma protease do leite (Eigel *et al.*, 1979). A família das K-caseínas (K-CN) constitui-se numa mistura de um componente sem glícido, contendo 169 resíduos de aminoácidos (Mercier *et al.*, 1973), e pelo menos mais seis componentes menores havendo duas variantes genéticas A e B (Eigel *et al.*, 1984).

As  $\alpha$  e K-caseínas foram determinadas em leites e queijos através de ensaios imunonefelométricos em micropartículas (Collard-Bovy *et al.*, 1991), com excelentes resultados. Micropartículas previamente preparadas (MS- $\alpha_s$ -CN e MS-K-CN) respectivamente micropartículas com  $\alpha_s$  e K-caseínas na superfície, adequadamente conservadas a temperaturas baixas, permitiram determinar essas proteínas em leite e queijo sem exigir qualquer tratamento prévio. Foi possível determinar as  $\alpha_s$ -CN

e K-CN em leite diluído, respectivamente 36.000 e 72.000 vezes! Aproximadamente 100 e 300  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -CN e de K-CN, respectivamente, eram suficientes nas misturas de reacção para produzir 50% de inibição. Os queijos Camembert (queijo mole) e o queijo Saint Paulin (queijo prensado) foram também utilizados para a determinação daquelas caseínas, com excelentes resultados. Nestas aplicações o método imunonefelométrico em micropartículas comparado com o método imunonefelométrico clássico forneceu resultados mais confiáveis, pois permitiu eliminar os erros decorrentes do excesso de antigénio. Mostrou-se também económico no consumo dos anticorpos, pois estes são sempre usados em muito baixas concentrações. Não exigiu tratamento prévio das amostras, dada a possibilidade de poderem ser analisadas em pequeníssimas concentrações tendo em conta a grande sensibilidade do método. Por outro lado os coeficientes de variação mostraram-se muito baixos (menores do que 6%).

As  $\beta$ -caseínas ( $\beta$ -CN) foram também determinadas em leite utilizando a mesma metodologia (El Bari *et al.*, 1991) em micropartículas (MS- $\beta$ -CN) previamente preparadas e armazenadas a temperaturas baixas na presença de azida de sódio. Nas condições adequadas de operação laboratorial é possível obter 50% de inibição da imunoaglutinação utilizando 17,0  $\mu\text{g}$ . L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CN na mistura de reacção, tendo-se verificado que a adição de  $\alpha$ -CN ( $\alpha$ -caseína),  $\beta$ -LG ( $\beta$ -lactoglobulina) e  $\alpha$ -LA ( $\alpha$ -lactoalbumina) não alteram a imunoaglutinação. Contudo a K-CN (K-caseína) interfere, mas com menor sensibilidade, sendo necessários 390  $\mu\text{g/L}$  para produzir 50% de inibição. Para leites diluídos 400.000 vezes na mistura de ensaio as determinações mostravam-se com boa reproductibilidade, com coeficientes de variação menores do que 4,5% para dez ensaios consecutivos.

Este método foi também proposto para detectar a alteração da  $\beta$ -CN durante a sua proteólise pela plasmina e por tratamento térmico (El Bari *et al.*, 1992). A proteólise da  $\beta$ -CN em leite bovino pela proteinase alcalina ou plasmina produz três peptídeos hidrófobos na região C-terminal (clivagem entre os resíduos 28/29, 105/106 e 107/108) (Humbert e Alais, 1979) e os complementares peptídeos hidrofílicos relativos ao N-terminal (Eigel, 1977).

A aglutinação de MS- $\beta$ -CN pelo anti-soro anti- $\beta$ -CN é inibida na presença de  $\beta$ -CN permitindo a determinação rápida da caseína, com alta sensibilidade (1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e com grande precisão (El Bari *et al.*, 1992). Os mesmos autores verificaram que a imunorreatividade dos peptídeos  $\beta$ -CN-f (1-505/7) e  $\beta$ -CN-f (106-209) é mais preservada na caseína intacta do que nesses fragmentos e que a concentração livre de  $\beta$ -CN necessária para produzir 50% de inibição da imunoaglutinação é maior na presença daqueles fragmentos. O método mostrou-se também adequado a controlar a desnaturação térmica da  $\beta$ -CN a qual acima de 130°C determina a clivagem da sequência polipeptídica, como pôde ser observado pelo método electroforético em gel de poliacrilamida. Também o tratamento da  $\beta$ -CN pela plasmina com a consequente proteólise pôde ser avaliado já a partir

de quatro minutos da acção enzimática, através do aumento da concentração de proteína necessária para induzir 50% da aglutinação do conjugado MS- $\beta$ -CN com o anti-soro anti- $\beta$ -CN nativo. Assim foi possível concluir que a imunonefelometria em micropartículas além de permitir a quantificação de  $\beta$ -CN no leite bovino (El Bari, 1991) é também adequada para acompanhar a alteração da sua imunoreactividade durante a proteólise conduzida pela plasmina e pelo aquecimento.

Este método imunológico foi também aplicado com sucesso na determinação das caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e K) em 50 rebanhos da Normandia utilizando 1300 amostras de leite colectadas duas vezes por mês, durante 13 meses, permitindo assim obter informações rápidas acerca da qualidade do leite e sua importância para a indústria queijeira (Montagne *et al.* 1995).

#### 4. O CMP e sua determinação por imunonefelometria em micropartículas

A caseína K, uma das principais caseínas do leite bovino (Swaigood, 1992) estabilizante das micelas de caseína (Holt & Dalgleish, 1986), sofre clivagem hidrolítica entre os resíduos fenilalanina e metionina, respectivamente nas posições 105 e 106, na presença de quimosina existente no agente coagulante de origem gástrica. A quimosina é uma aspartilprotease específica para a ligação peptídica situada entre os resíduos 105 e 106, permitindo a obtenção de dois peptídeos de propriedades muito diferentes (Addeo *et al.*, 1984). Um deles é para-K-caseína formada por 105 aminoácidos, com peso molecular igual a 12000 Da, que precipita com as micelas de caseína na presença de  $Ca^{2+}$  e apresenta características hidrofóbicas; o outro (recuperado no soro) é normalmente designado por caseino-glicopeptídeo, caseino-macropéptídeo (CMP) ou glicomacropéptídeo (GMP), tendo apenas 65 aminoácidos, peso molecular de 8000 Da, sendo de natureza hidrofílica. Este peptídeo é o único que contém o resíduo fosfoserina e participa na ligação aos glicídios (Imbert e Nicholas, 1993).

O polimorfismo genético, isto é, as formas alélicas ou variantes genéticas da caseína K ocorrem no CMP, existindo a variante A e a variante B, que diferem nos aminoácidos situados nas posições 138 e 148. Os resíduos 138 e 148 da variante A, são, respectivamente, a treonina e o ácido aspártico; para a variante B têm-se, na mesma ordem, os resíduos isoleucina e alanina (Imbert e Nicolas, 1993).

Há proteínas de origem bacteriana (Shah, 1994) que também catalisam a hidrólise da K-caseína com obtenção de CMP (Law, 1979) e mesmo o armazenamento do leite a temperaturas baixas (4-7°C) permite a multiplicação desses microorganismos com consequências indesejáveis no fabrico do queijo. Também o leite ultrapasteurizado (leite UHT) não está imune à presença de bactérias resistentes ao tratamento térmico se o armazenamento do leite não for suficientemente curto.

A determinação de CMP na indústria leiteira reveste-se pois de grande interesse económico. É importante para acompanhar a acção da quimosina durante o fabrico do queijo, para medir o grau de proteólise durante o armazenamento do leite e também para a detecção de fraudes. Além disso o GMP parece estar destinado a tornar-se um ingrediente para alimentos dietéticos tendo em vista algumas propriedades biológicas que dele têm sido relatadas (Kawakami *et al.*, 1992).

A metodologia utilizada tem contado com métodos cromatográficos como o HPLC (Kawakami *et al.*, 1992; Sharma *et al.* 1993; Imbert e Nicolas, 1993), e o método imunológico ELISA (Picard *et al.* 1994). Os métodos cromatográficos são mais sensíveis que os outros métodos tradicionais embora a sua instrumentação, respectiva operação e manutenção sejam de custo elevado. O método imunológico ELISA é mais simples, apresenta grande sensibilidade e é mais acessível no que concerne à instrumentação. Deste têm sido referidas muitas aplicações na análise de leites e queijos, particularmente na detecção de fraudes (Castro, 1995).

Mais recentemente (Prin *et al.*, 1996) aplicou o método imunonefelométrico em micropartículas à determinação do CMP em leite fresco e armazenado, tendo fornecido resultados comparáveis aos do método ELISA (Picard *et al.* 1994). Observaram que os conjugados do CMP a microesferas hidrofílicas polifuncionais permaneciam imunorreativos durante vários meses quando conservados a -20°C e que a imunoaglutinação com anti-soro anti-KCN podia sofrer 50% de inibição na presença de CMP na concentração de 100  $\mu$ g/L e que era possível detectar 16  $\mu$ g/L do glicomacropéptídeo. Juntamente com a grande sensibilidade do método há a confirmar a excelente reproductibilidade.

A aplicação à determinação do conteúdo de CMP em leites armazenados a 4°C é muito importante, pois permite fazer uma avaliação da sua qualidade. É sabido que mesmo a essa temperatura a quimosina é ativa determinando a proteólise da caseína K com a obtenção dos respectivos glicomacropéptídeos em quantidades pequenas. Assim sendo a simples determinação desta caseína não é decisiva para a quantificação da hidrólise. Há que aplicar um método para medir directamente o CMP e isso foi também realizado pelos mesmos investigadores para 30 leites diferentes, tendo sido detectados nos ultrafiltrados concentrações compreendidas entre 0,56 e 2,48 mg/L.

Muito provavelmente este método imunonefelométrico não permite distinguir o CMP A do CMP B, como é possível utilizando métodos cromatográficos de alta resolução (HPLC) após tratamento das amostras (leites ou queijos) com ácido tricloroacético para insolubilizar as proteínas (Imbert *et al.*, 1993) ou após ultrafiltração para garantir todas as formas glicosiladas dos CMP (Kawakami *et al.*, 1992). É reconhecido que tais métodos cromatográficos de alta resolução, embora sejam dotados de alta especificidade são muito caros e relativamente lentos, não se justificando a sua utilização nos centros de produção ou utilização leiteira para o controle de qualidade. É mais adequado o

método da imunonefelometria em micropartículas pelo conjunto de características que foram descritas nas várias aplicações.

Comparativamente ao método ELISA (Picard *et al.*, 1994) a técnica imunonefelométrica em micropartículas mostrou-se também sensível, específica, simples, também relativamente de baixo custo, mas mais rápida, por dispensar pré-tratamentos das amostras e lavagens sucessivas inerentes ao método imunoenzimático.

## 5. Conclusões

Os métodos tradicionais de avaliação da qualidade de leites e queijos, embora ainda sejam adequados, têm-se enriquecido e completado com a aplicação das novas técnicas imunoanalíticas nas suas várias modalidades. Mais recentemente tem-se destacado a imunonefelometria microparticulada que, inicialmente desenvolvida para a análise no campo da biologia humana, tem tido crescente aplicação no domínio das análises agroalimentares, tendo em conta as suas características de alta especificidade, sensibilidade, simplicidade e rapidez.

No que concerne à imunonefelometria em micropartículas tem sido possível sintetizar micropartículas hidrofílicas de tamanho controlado, recobri-las de um dado antigénio, aptas a serem aglutinadas pelo respectivo anticorpo. O decréscimo do sinal nefelométrico obtido em tal aglutinação na presença de antigénio livre é proporcional à concentração deste, o que permite estabelecer uma curva padrão de análise.

A aplicação desta metodologia à determinação quantitativa das caseínas de leites e queijos tem sido possível, de um modo fácil, com excelentes resultados, sem necessidade de lavagens ou separação de fases, sem interferências, sem tratamentos prévios, com rapidez e rigor quantitativo e a custos relativamente baixos.

## 6. Referências bibliográficas

- Addeo, F., Martin, P. e Ribadeau-Dumas, B. (1984). Susceptibility of buffalo and cow K-caseins to chymosin action. *Milchwissenschaft* 39, 202-205.
- Andrews, A.T., Taylor, M.D. e Owen, A.J. (1985). Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 348 : 177-185.
- Beck, N.F.G., e Tucker, H.A. (1977). Relationships between radioimmunoassays of  $\alpha$ -lactalbumin and prolactin in bovine skim milk. *J. Dairy Sci.* 60, 542-545.
- Bican, P., e Blanc, B. (1982). Milk protein analysis. A high performance chromatography study. *Milchwissenschaft* 37, 592-593.
- Castro, V.R. Osório e (1995). Métodos imunológicos na detecção de fraudes em leite e queijo de ovinos. *Agroforum*, nºs 8 e 9, 19-26.
- Collard-Bovy C., Marchal, E., Humbert G., Linden G., Montagne, P., El Bari, N. e Duheille J. (1991). Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay. 1-Measurement of  $\alpha$ -casein and k-casein. *J. Dairy Sci.* 74, 3695-3701.
- Duheille J., Pau B. e Gros P. Réactif permettant un dosage de très haute sensibilité de l'antigène caractéristique du virus de l'hépatite B dans les liquides biologiques humains (1982). Eur patent 0104101B1 em posse da Sanofi (França).
- Eigel, W.N. (1977). Formation of gamma 1-A2, and gamma 2-A2, and gamma 3-A2 caseins by "in vitro" proteolysis of beta-casein A2 with bovine plasmin. *International Journal of Biochemistry* 8, 187-192.
- Eigel, W.N., Hofman, C.J., Chibber, B.A.K., Tomich, J.M., Keenen T.W. e Mertz, E.T. (1979). Plasmin mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 2244-2248.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrel, Jr. H.M., Harwalkar, V.R., Jeness, R. e Whitney, R. McL. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67, 1599-1631.
- El Bari, N., Montagne, P., Humbert, G., Cuilliere, M.L., Varcin, P., Linden, P., Linden, G. e Duheille J. (1991). Development of a microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for the quantification of beta-casein in milk. *Food & Agricultural immunology* 3, 63-71.
- El Bari, N., Montagne P., Cuilliere, M.L., Humbert, G., Linden G. e Duheille, J. (1992). Study of  $\beta$ -casein denaturation by microparticle-enhanced nephelometric immunoassay 4, 229-240.
- El Hamoui, A.K., Montagne, P., Humbert, G., Kittler, H., e Duheille, J. (1982). Immunonefelometric assay for the major proteins of cow's milk. *Ann. Biol. Clin.* 40, 449-449.
- Grosclaude, F., Joudrier, P. e Mahé, M.F. (1979). A genetic and biochemical analysis of a polymorphism of bovine  $\alpha$ -casein. *J. Dairy Res.* 46, 211-218.
- Hanson, L.A., e Mansson I. (1961). Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products. *Acta Paediatr.* 50, 484-491.
- Hanson, L.A., e Johansson B.G. (1970). Immunological studies of milk. Página 45 em *Milk Proteins: chemistry and molecular biology*. Vol.1, H.A. McKenzie, ed. Academic Press, New York, N.Y.
- Holt, C. e Dagleish, D.G. (1986). Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. *Journal of Colloid and Interface Science* 114, 513-524.
- Humbert, G. e Alais, C. (1979). Review of the progress of dairy science: the milk proteinase system. *Journal of Dairy Research* 46, 559-571.
- Imbert, A. e Nicolas, M. (1993). Détection dans le lait de lactosérums d'origine enzymatique par identification de leurs caséinomacropéptides. *Science des Aliments* 13, 545-558.
- Kawakami, H., Kawasaki, Y., Dosako, S., Tanimoto, M. e Nakajima I. (1992). Determination of k-casein glycomacropéptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic pretreatment. *Milchwissenschaft* 47, 688-693.
- Law, B.A. (1979). Reviews of the progress of dairy science. Enzymes of psychotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research* 46, 573-588.
- Lefier, D. e Colin, J.C. (1982). Contribution au dosage des caséines Kappa de vache par une méthode immunoenzymatique. *Lait* 62, 541-548.
- Marchand J., Varcin P., Piochet D., Montagne P., Cuillière M.L., Duheille J. e Pau B. (1992). Synthesis of new hydrophilic microspheres: optimization carriers for microparticle-enhanced nephelometric immunoassays. *Biopolymers* 32, 971-980.

- Marth, E.H. (1978). Standard methods for the examination of dairy products. 14<sup>th</sup> ed. Am. Publ. Health. Assoc., Washington, D.C.
- McLean, D.M., Graham, E.R.B. e McKenzie, H.A. (1982). Estimation of casein composition by electrophoresis. Page 221 in Proc. 21<sup>st</sup> Inst. Dairy Congr., Book 2. Mir Publishers, Moscow, USSR.
- Mercier, J.C., Brignon, G. e Ribadeau-Dumas B. (1973). Structure primaire de la caséine k bovine. Séquence complète. Eur. J. Biochem. 35, 222-235.
- Montagne, P., Cuillière, M.L., e Duheille, J. (1980). Highly sensitive immunonephelometric assay detecting Clq-binding immune complexes. 4<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Paris, France, Abstract 15-7-15.
- Montagne P., Cuillière, M.L., Marchal, E., El Bari, N., Montagne M., Benali, M., Faure, G., Duheille, J., Humbert, G., Linden G., Heurtaux, N., Blesche, J.L. Gosselin, D., Desmares, A. e Delahaye, D. (1995). Application des dosages par immunonéphélométrie microparticulaire des caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et K à l'évaluation de la qualité du lait, de sa production à sa valorization fromagère. Lait 75, 211-237.
- Peterson, R.F. (1963). High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. J. Dairy Sci. 46, 1136-1139.
- Picard, C., Plard, I., Rongdaux-Gaida, D. e Collin, J.C. (1994). Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. Journal of Dairy Research 61, 395-404.
- Prin, C., El Bari, N., Montagne, P., Cuillière, ML., Bene, MC., Faure, G., Humbert, G. e Linden, G. (1996). Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for caseinomacropeptide in milk. Journal of Dairy Research 63, 73-81.
- Ribadeau-Dumas, B., Brignon G., Grosclaude, F. e Mercier JC (1972). Structure primaire de la caséine béta bovine. Séquence complete. Eur. J. Biochem. 25, 505-514.
- Ritterburg, J.H., Ghafar, A., Smith, C.J., Adams, S, e Allen J.C. (1984). The estimation of casein in milk by an enzyme linked immunosorbent assay. Página 319 em Challenges to contemporary dairy analytical techniques. Special Publ. 49. R. Soc. Chem. Burlington House, London, Engl.
- Schliep, G. e Felgenhauer, K. (1978). Rapid determination of proteins in serum and cerebrospinal fluid by laser nephelometry. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 631-635.
- Shah, N.P. (1994). Psychotrophs in milk: a review. Milchwissenschaft, 49, 432-437.
- Sharma, S.K., Hill, A.R. e Mittal, G.S. (1993). An improved method to measure glycomacropeptides (GMP) in renneted milk. Milchwissenschaft 48, 71-73.
- Sieber, A. e Gross, J. (1976). Determination of proteins by laser nephelometry. Laboratoriumblatter 26, 117-123.
- Swaigood, H.E. (1992). Chemistry of the caseins. In Advanced Dairy Chemistry - 1. Proteins, pp. 63-110 (Ed. P.F. Fox). London: Elsevier Applied Science Publishers.

\* Professor Coordenador da Escola Superior Agrária

Quem pode candidatar-se aos cursos da Escola Superior Agrária?...



Estudantes que tenham concluído:

- 12<sup>o</sup> ano do ensino secundário, via de ensino;
- 12<sup>o</sup> ano do ensino secundário, via técnico-profissional agrícola;
- Candidatos aprovados em exames "ad hoc";
- Bolseiros de outros países.

Nota mínima de ingresso - 9,5 valores