

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Renata Bongioiolo Magenis

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
REOLÓGICAS E DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR SDS-PAGE
DE QUEIJO MINAS FRESCAL

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Elane Schwinden Prudêncio, Dr^a.

Coorientador: Heitor Daguer, Dr.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Magenis, Renata Bongioiolo
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, REOLÓGICAS E
DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR SDS-PAGE DE QUEIJO MINAS
FRESICAL / Renata Bongioiolo Magenis ; orientador, Elane
Schwinden Prudêncio ; coorientador, Heitor Daguer. -
Florianópolis, SC, 2015.
116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Queijo Minas Frescal. 3.
Autenticidade. 4. Perfil eletroforético. 5. Inspeção de
produtos lácteos. I. Prudêncio, Elane Schwinden . II.
Daguer, Heitor . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. IV. Título.

Renata Bongioiolo Magenis

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
REOLÓGICAS E DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR SDS-
PAGE DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de “Doutora em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de agosto de 2015.

Prof^a. Dr^a. Roseane Fett
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação – PGCAL/CCA/UFSC

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elane Schwinden Prudêncio - PGCAL/CCA/UFSC
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards - UFSM

Prof^a. Dr^a. Carlise Beddin Fritzen Freire - IFSC

Prof^a. Dr^a. Carmen Maria Olivera Müller - PGCAL/CCA/UFSC

Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni
PGCAL/CCA/UFSC

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna - PGCAL/CCA/UFSC

“Afinal, há é que ter paciência, dar tempo ao tempo, já devíamos ter aprendido, e de uma vez pra sempre, que o destino tem de fazer muitos rodeios para chegar a qualquer parte.”

José Saramago

Dedico este trabalho ao meu amigo Daniel Macedo Lorenzini
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, sempre!

Aos meus pais Agenor e Cladir, minha irmã e meu ‘cunha’ Rui, meu irmão Rodrigo e minha cunhada Deise, minhas sobrinhas lindas e apaixonantes, Maria Luiza e Ana... por acreditarem, torcerem, rezarem, e me apoiarem, cada um do seu jeito!

À Universidade Federal de Santa Catarina que proporcionou minha formação acadêmica.

À CAPES e ao CNPq/projeto SAGRES pelas bolsas de estudo.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PGCAL) e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL) que convivi e que participaram de todos esses anos de estudos.

Ao Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC) do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO – RS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por aceitar e apoiar a execução desse projeto.

À EMBRAPA Agrobiologia – Seropédica - RJ, por intermédio da pesquisadora Marília Penteado Stephan pelo apoio ao projeto e ao pesquisador Antônio Sílvio do Egito da EMBRAPA Caprinos e Ovinos – Sobral - CE pelos esclarecimentos.

À minha orientadora Professora Elane Schwinden Prudêncio pela paciência, confiança, amizade e parceria não só no doutorado, mas nesses vários anos de CAL.

Ao Daniel Macedo Lorenzini (*in memoriam*) por todo apoio, parceria, discussões, risadas, choros, confusões, desabafos...e por ter acreditado mais do que todos que esse projeto daria certo.

Ao Fiscal Federal Agropecuário Dr. Heitor Daguer que não medi esforços para que esse projeto se realizasse, por acreditar em mim, me apoiar, pensar e batalhar comigo, pelas tardes de discussões e por segurar comigo todas as barras que foram surgindo pelo caminho.

Aos coautores dessa tese, pelas contribuições.

Aos funcionários do SLAV-SC/LANAGRO-RS pela ajuda e pelas conversas, em especial à médica veterinária Maria Salete Pimentel e ao farmacêutico Fabiano Barreto.

Aos bolsistas do MAPA que ajudaram nesse trabalho, em especial à Isabella De Bona Muñoz, Andressa Camargo Valesse, Lilian Mazurechen, Gabriela Pirassol de Oliveira, André Weber, Ana Paula Mello e Andrey Diniz.

Ao professor Hernán Terenzi por ter possibilitado a realização de análises no Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME - UFSC) e à Martina Blank pela condução das análises.

À professora Maria Risoleta Freire Marques por ter cedido seu laboratório e ao seu aluno Jacó pelo auxílio nas análises.

Ao professor Marcelo Menezes Reis do Departamento de Estatística da UFSC pelas discussões e auxílio nas análises estatísticas.

Às meninas do Laboratório de Leite e Derivados pelo apoio, ajuda e companhia.

Aos professores e colegas do Programa de Pós Graduação pelo convívio e aprendizado.

Ao relator e aos membros das bancas de qualificação e de defesa desse trabalho pela participação e pelas contribuições.

Aos meus familiares e meus amigos da vida que me apoiam e torcem por mim e mesmo que distantes estão sempre por perto.

Enfim, são tantas pessoas que participaram desses anos de estudos e que dividiram comigo bons momentos e outros bastante difíceis e que serei eternamente grata!

Muito Obrigada!!!

RESUMO

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil, contudo o Regulamento de Identidade e Qualidade desse produto define parâmetros de qualidade somente quanto ao teor de umidade, gordura e das suas propriedades sensoriais. Pesquisas evidenciam a falta de padronização na obtenção do queijo Minas Frescal resultando em grandes variações entre os produtos comercializados no Brasil. Neste contexto, este trabalho visou inicialmente a avaliação das características físico-químicas (cor, umidade, proteína e gordura), das propriedades reológicas (tensão de ruptura, deformação de ruptura, grau de solidez e taxa de decaimento da força), bem como da autenticidade (através da SDS-PAGE) de 21 amostras comerciais de queijo Minas Frescal adquiridas na região sul do Brasil. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar ampla variação nas amostras avaliadas neste trabalho, sendo que as mesmas apresentaram tendência à coloração branca amarelada. Os teores de umidade e proteína influenciaram as propriedades reológicas e os queijos apresentaram-se mais viscosos e firmes. A SDS-PAGE revelou ampla e inesperada variabilidade nos perfis proteicos e na razão das proteínas caseína / β -lactoglobulina, permitindo assim distinguir queijos autênticos e adulterados. Os perfis proteicos sugerem a presença de soro de leite na composição desses produtos, contrariando o processo enzimático legalmente requerido para a elaboração do queijo Minas Frescal. A partir disso, um método qualitativo foi desenvolvido para auxiliar na inspeção da autenticidade da composição do queijo Minas Frescal quando há suspeita de substituição irregular de leite por soro de leite. O método que utilizou eletroforese em gel de poliacrilamida na presença do desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguido pela densitometria da imagem do gel obtido, foi validado. Os queijos foram liofilizados para serem submetidos à eletroforese e a proteína β -lactoglobulina (β -LG) foi escolhida como o marcador de adulteração. A confirmação da identificação do marcador foi realizada através da digestão da banda do gel em tripsina, seguido pela análise dos peptídeos obtidos em espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Os queijos que apresentarem no mínimo 14 mg.g^{-1} de β -LG foram considerados adulterados. O método mostrou precisão satisfatória, com um limite de detecção de 7 mg.g^{-1} . Quarenta e duas amostras comerciais de estabelecimentos inspecionados foram avaliadas e submetidas à análise de *Cluster*. Grupos de amostras conformes e não conformes

foram obtidos com 24 (57%) amostras autênticas e 18 (43%) amostras adulteradas, respectivamente. Por fim, este trabalho demonstra que o monitoramento analítico adequado é necessário para inibir essa prática de adulteração e reforça a necessidade de controle mais efetivo, principalmente na seleção de matéria-prima, com o objetivo de oferecer produtos autênticos aos consumidores.

Palavras chave: Queijo Minas Frescal, Reologia, Cor, Perfil eletroforético, Autenticidade, SDS-PAGE, Adulterações, Inspeção de produtos lácteos, Soro de leite.

ABSTRACT

The Minas Frescal cheese is a dairy products most consumed in Brazil. The Identity and Quality Regulation of this product defines quality parameters as well as the moisture and fat content and the sensorial properties. However, research has shown the lack of standardization in getting the cheeses resulting in differences in the composition and quality which would result in large variations between products sold in Brazil. In this context, this work aimed initially to assess physicochemical (color, moisture, protein and fat content) and rheological properties (fracture stress, fracture strain, degree of solidity and stress decay), as well as to assess the authenticity (using SDS-PAGE) of Minas Frescal cheese in 21 commercial samples acquired in Southern Brazil. From the results obtained, in general, large difference among the samples and tendency to yellowish white color were observed. Moisture and protein influenced on the rheological properties and cheeses showed a tendency to being viscous and firm. SDS-PAGE revealed a wide unexpected variability in their proteins profiles and a densitometric casein/ β -lactoglobulin ratio allowed to distinguish authentic cheese from adulterated ones. The profiles suggest the irregular presence of whey in the composition of these products, contrary to the enzymatic process legally required. From this, a qualitative method was developed to inspect the compositional authenticity of white non-ripened cheeses like Minas Frescal, a typical Brazilian cheese, especially when irregular replacement of milk by whey is suspected. A sodium-dodecyl sulfate gel electrophoresis (SDS-PAGE) method, followed by image densitometry, was validated. Cheeses were freeze-dried to electrophoresis, and β -lactoglobulin (β -LG) was chosen as the adulteration marker. In-gel trypsin digestion followed by matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry provided its identification. Cheeses with a minimum of 14 mg.g^{-1} of β -LG are considered to be adulterated. The method shows satisfactory precision with a detection limit of 7 mg.g^{-1} . Forty-two commercial samples from inspected establishments were then assessed and subjected to cluster analysis. Compliant and non-compliant groups were settled with 24 (57%) authentic samples and 18 (43%) adulterated samples, respectively. Finally, this work demonstrates that the appropriate analytical monitoring is required to inhibit the practice of adulteration and emphasize the need for a more effective control, mainly in the

selection of raw materials, aiming to offer consumers authentic products.

Keywords: Minas Frescal cheese, Rheology, Color, Electrophoretic profile, Authenticity, SDS-PAGE; Adulterations; Dairy inspection; Whey.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** Exemplo de curva de força x deformação obtida na análise de compressão uniaxial de queijo..... 34
- Figura 2** Curva típica do teste de relaxação (força x tempo) de queijo.....35
- Figura 3** Coordenadas para medida instrumental da cor pelo sistema CIELAB..... 37
- Figura 4** Perfil eletroforético de leite e soro de leite e a identificação das principais proteínas constituintes desses produtos. PMM: Padrão de massa molecular.. 39

Capítulo 2

- Figure 1** SDS-PAGE patterns of proteins from molecular weight standards (MWS), commercial Minas Frescal cheeses (1 up to 21) and milk.....73
- Figure 2** Results of the average \pm standard deviation of the casein/ β -lactoglobulin ratio from densitometry analysis (n = 3)..... 74

Capítulo 3

- Figure 1** SDS-PAGE electrophoretic proteins profile of a Minas Frescal cheese reference sample, demineralized whey powder and defatted milk powder (a) and respective densitograms (b). α -LA: alfa-lactalbumin; β -LG: beta-lactoglobulin; MWS: molecular weight standards (6.5 to 200 kDa)..... 94
- Figure 2** SDS-PAGE electrophoretic profiles (A) and mean values (n = 2) of β -LG optical densities (B) from commercial samples (lanes 1-42) and from reference samples (lanes 43-47) of Minas Frescal cheese..... 96
- Figure 3** Electrophoretic profile (A) and linear regression (B) from a blank sample of Minas Frescal cheese fortified with β -lactoglobulin in different concentrations versus the respective optical density..... 99

Figure 4

Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrum of *Bos taurus* β -lactoglobulin after in-gel digestion with trypsin.....101

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Composição físico-química do queijo Minas Frescal e Ricota.....	31
-----------------	---	----

Capítulo 2

Table 1	Physicochemical composition and color parameters (L*, a*, b*) of the commercial minas frescal cheeses.	66
Table 2	Results of rheological parameters of uniaxial compression and relaxation of commercial minas Frescal cheeses samples.....	69

Capítulo 3

Table 1	Validation data for the qualitative control method to inspect compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis.....	100
Table 2	Theoretical (expected) and experimental (detected) β -lactoglobulin peptides (m/z) obtained by tryptic digestions in solution.....	102

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
CAPÍTULO 1.....	25
1 Revisão Bibliográfica	27
1.1 Queijo	27
1.2 Propriedades físicas dos queijos	31
1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
1.4 Autenticidade de produtos lácteos	39
1.5 Validação de metodologias e métodos qualitativos	41
Referências	43
CAPÍTULO 2.....	57
Avaliação reológica, físico-química e da autenticidade de queijos Minas Frescal.....	57
Resumo.....	59
Abstract	60
1 Introduction	61
2 Material and methods	62
2.1 Minas Frescal cheese samples	62
2.2 Physicochemical analysis	62
2.3 Color analysis	62
2.4 Rheological properties.....	63
2.5 Authenticity assessment	64
2.6 Statistical analysis	65
3 Results and discussion.....	65
3.1 Physicochemical analysis	65
3.2 Color analysis	67
3.3 Rheological properties.....	68
3.4 Authenticity assessment	71
4 Conclusions	75
Acknowledgments	76
References	77
CAPÍTULO 3.....	83
Método de controle para inspecionar a autenticidade da composição de queijo Minas Frescal por eletroforese em gel.....	83
Resumo.....	85
Abstract	86

1 Introduction.....	87
2 Materials and methods	88
2.1 Materials.....	88
2.2 Reference samples.....	89
2.3 SDS-PAGE analysis.....	89
2.4 Selection of a marker protein	90
2.5 Establishment of an action level.....	90
2.6 Performance characteristics of method	91
2.6.1 Confirmation of identity of the marker protein and selectivity/specificity.....	91
2.6.2 Limit of detection (LoD).....	92
2.6.3 Precision.....	92
3 Results and discussion.....	93
3.1 SDS-PAGE analysis.....	93
3.2 Selection of a marker protein	93
3.3 Establishment of an action level.....	95
3.4 Performance characteristics of method	100
Acknowledgments.....	103
References	104

CONSIDERAÇÕES FINAIS 109

ANEXOS 111

Anexo A - Artigo intitulado “Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese” publicado no periódico <i>Food Control</i> (ISSN: 0956-7135).	113
Anexo B - Artigo intitulado: “A control method to inspect the compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis” publicado no periódico <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> (ISSN 0021-8561)	114
Anexo C - Trabalhos parciais apresentados em eventos	115

INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil (PLANZER JUNIOR et al., 2009). O processamento deste queijo ocorre através da coagulação do leite com enzimas apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997), resultando na desestabilização das micelas de caseína. Dessa forma, as caseínas são retidas no coágulo e as proteínas do soro são drenadas para a fase aquosa, denominada de soro de leite (CHROMIK et al., 2010). A Ricota, queijo proveniente do soro de leite e associação do calor com ácido, pode ser adicionada de leite, e no Brasil a adição de até 20% de leite sob o volume inicial de soro é permitida na sua formulação (BRASIL, 1952). De acordo com Pizzilo et al. (2005) a adição de leite é recomendada por proporcionar características de maciez e cremosidade ao produto, resultando na melhoria de suas propriedades sensoriais.

Quanto às propriedades sensoriais, o queijo Minas Frescal e a Ricota podem gerar certa confusão ao consumidor, pois são semelhantes quanto à consistência macia, à coloração branca e às poucas olhaduras mecânicas existentes na massa. Contudo, os consumidores esperam que os queijos sejam reprodutíveis e consistentes, não só quanto às propriedades sensoriais, mas também quanto à sua composição e qualidade. A avaliação das propriedades físico-químicas e de textura dos queijos é importante para a proteção da diversidade, contribuindo para dados de referência do controle de qualidade e padronização destes produtos pelas indústrias.

Alguns autores evidenciam que a falta de padronização na obtenção do queijo Minas Frescal é responsável pela diferença na sua composição e qualidade (CRUZ, GOMES, 2001; ROCHA, BURITI, SAAD, 2006; CARVALHO, VIOTTO, KUAYE, 2007; RIBEIRO, SIMÕES, JURKIEWICZ, 2009), o que resulta nas grandes variações entre os produtos comercializados no Brasil. Entretanto, vale ressaltar que o Regulamento de Identidade e Qualidade do queijo Minas Frescal define parâmetros de qualidade tanto quanto ao teor de umidade e gordura quanto às propriedades sensoriais (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004; BRASIL, 2006).

O aumento da consciência dos consumidores acerca da composição dos alimentos tem resultado na necessidade de reavaliar as informações contidas nas embalagens a fim de orientá-los na escolha dos alimentos (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008). Rodríguez et al. (2010) afirmam que os queijos devem ser corretamente rotulados e

segundo De La Fuente e Juárez (2005) uma matéria-prima ou produto final devem fornecer informações na rotulagem, principalmente em termos de ingredientes e tecnologia de produção.

Rodríguez et al. (2010) e Santos, Pereira-Filho e Rodriguez-Saona (2013) relatam a necessidade da realização de estudos que identifiquem a autenticidade de produtos a fim de prevenir adulterações, protegendo tanto as indústrias produtoras como os consumidores. Moore, Spink e Lipp (2012) também ressaltam que esta é uma preocupação das autoridades de fiscalização, tendo em vista que os produtos lácteos estão entre os produtos alimentícios passíveis de serem adulterados. Estes autores também afirmam que o leite está entre os sete alimentos que mais sofrem adulterações e nesse contexto, os produtos lácteos são de particular interesse, pois são um grupo de alimentos que desempenham um papel importante na alimentação da população e são essenciais para certos grupos de consumidores (DE LA FUENTE; JUAREZ, 2005; AQUINO et al., 2014). Na indústria láctea, as adulterações comerciais geralmente envolvem a substituição de leites de alto valor agregado por matérias-primas de menor custo (OANCEA, 2009). Comumente, as principais investigações envolvendo a autenticidade de queijos dizem respeito à espécie de origem do leite utilizado na elaboração desses produtos (CARTONI et al., 1999; MOATSOU et al., 2004; COLAK et al., 2006; HURLEY et al., 2006; CZERWENKA; MULLER; LINDNER, 2010; RODRÍGUEZ et al., 2010; PESIC et al., 2011; GANOPOULOS et al., 2013; GUERREIRO et al., 2013). Vários estudos tem contribuído para a avaliação da qualidade de queijo Minas Frescal (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a; FRITZEN-FREIRE et al., 2010b; PIAZZON-GOMES; PRUDÊNCIO; SILVA, 2010), no entanto, pesquisa envolvendo a avaliação da autenticidade do queijo Minas Frescal é inexistente. Desta forma, este trabalho está dividido nos seguintes capítulos:

- a) Capítulo 1: **Revisão Bibliográfica**, que aborda os principais temas envolvidos no trabalho, como queijo, propriedades físicas dos queijos, eletroforese em gel de poliacrilamida, autenticidade de produtos lácteos e validação de metodologias e métodos qualitativos.
- b) Capítulo 2: **Avaliação reológica, físico-química e da autenticidade de queijos Minas Frescal**, cujo objetivo foi avaliar as características de identidade e qualidade de

queijos Minas Frescal através da avaliação das propriedades físico-químicas e reológicas, bem como da autenticidade de queijos Minas Frescal comerciais produzidos por diferentes indústrias.

- c) Capítulos 3: **Método de controle para inspecionar a autenticidade da composição de queijo Minas Frescal por eletroforese em gel**, cujo objetivo foi validar uma metodologia de análise qualitativa utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de adulterações do queijo Minas Frescal.

Os artigos publicados em revistas indexadas (Anexos A e B) e os comprovantes dos trabalhos parciais publicados em eventos científicos da área de Ciência dos Alimentos (Anexo C) estão apresentados em anexo.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Queijo

Queijo é um produto lácteo que tem desempenhado um importante papel na alimentação humana há séculos (HINRICHS, 2001). É um alimento nutritivo e versátil, e uma grande variedade de tipos está disponível para satisfazer os requisitos específicos dos consumidores e permitir a conveniência na utilização (FOX; McSWEENEY, 2004). Essa grande variedade de queijos baseia-se principalmente nas diferentes condições regionais e na tecnologia de produção, as quais têm sido constantemente adaptados e otimizados (HINRICHS, 2001).

O consumo de queijos no Brasil apresenta-se pouco significativo frente ao consumo mundial, porém, este mercado vem crescendo rapidamente nos últimos anos (LAW; TAMIME, 2010) e na última década esse consumo aumentou de 2,5 para 3,6 kg/ per capita/ ano (FAGUNDES, 2013).

No processo tradicional de fabricação de queijo entre 6 a 30 kg de leite é recuperado na forma de coágulo a partir de 100 kg de leite, dependendo do tipo de queijo, enquanto o restante é representado por soro de leite (HINRICHS, 2001). A hidrólise enzimática que ocorre na produção de um queijo resulta no rompimento da ligação entre os aminoácidos 105 (Fenilalanina) e 106 (Metionina) da κ -caseína na superfície das micelas, liberando um peptídeo hidrofílico C-terminal (glico- ou caseíno-macropéptídeo) para a fase líquida (soro) e outro peptídeo hidrofóbico formado pela parte restante da caseína (para- κ -caseína). O rompimento da κ -caseína promove a desestabilização das demais caseínas que se agregam e formam o coágulo (FOX; COOGAN, 2004; ST-GELAIS, HACHÉ, 2005). As caseínas representam cerca de 80% das proteínas do leite, apresentam-se na forma de micelas e são classificadas em quatro subgrupos (α , β , κ e γ) com massa molecular na faixa de 19 a 25 kDa (FARRELL JÚNIOR et al., 2004). Esse grupo de proteínas é mais suscetível à hidrólise, sendo a κ -caseína, localizada na superfície da micela, a mais hidrofílica, atua como estabilizadora em virtude de sua estrutura e localização, e dessa forma, não permite a precipitação das demais caseínas sensíveis ao cálcio localizadas no interior da micela (FOX et al., 2000; SGARBIERI, 2005).

As proteínas do soro representam aproximadamente 20 % do total das proteínas do leite e incluem a β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbumina (α -LA), imunoglobulinas (IG), albumina sérica bovina

(BSA) e lactoferrina (LF), principalmente. A concentração das proteínas do soro depende do tipo de soro (ácido ou doce, obtido pela coagulação enzimática) entre outros fatores (PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001), mas em geral, a concentração média das principais proteínas é de $3,2 \text{ g L}^{-1}$, $1,2 \text{ g L}^{-1}$, $0,8 \text{ g L}^{-1}$, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ e $0,2 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (DE WIT, 1998) e apresentam massas moleculares em torno de 18 kDa, 14 kDa, maior que 146 kDa, 66 kDa e 86 kDa, respectivamente (MORR; HA, 1993).

A estrutura essencial da matriz de queijo é formada pelos nutrientes insolúveis, representados pelas caseínas coaguladas, pelos minerais coloidais, pela gordura e pelas vitaminas lipossolúveis. Os demais constituintes do leite, solúveis em água, são drenados para o soro e são representados pelas proteínas do soro, pela lactose, vitaminas solúveis em água e alguns minerais (FOX; McSWEENEY, 2004). No entanto, o teor de nutrientes presentes no queijo é influenciado pelo tipo de leite utilizado, pelo processo de fabricação e pelo grau de maturação (El-NIMR et al., 2010).

A qualidade do queijo é determinada pelos consumidores, entre outros fatores, pelo seu sabor, pelas suas propriedades de textura, pelo aspecto visual e características nutricionais (FOX; COGAN, 2004; PIZZILLO et al., 2005), que por sua vez são originadas a partir da combinação de características microbiológicas, bioquímicas e tecnológicas (PEREIRA; GOMES; MALCATA, 2009). Os consumidores esperam que os queijos apresentem certa reprodutibilidade entre os produtos do mesmo lote e entre lotes de diferentes épocas de produção, principalmente para os queijos produzidos em larga escala (FOX; COGAN, 2004). Dentre os queijos produzidos e comercializados em larga escala no Brasil tem-se o Minas Frescal e a Ricota.

O queijo Minas Frescal é considerado um queijo genuinamente brasileiro e um dos mais populares do país, consumido em todo o território nacional e por todas as camadas da população (NALDINI; VIOTTO; KUAYE, 2009; PLANZER JUNIOR et al., 2009). Entre os queijos mais consumidos no Brasil no período de 1991 e 2009, o queijo Minas Frescal foi precedido somente pelos queijos muçarela, prato, requeijão culinário e cremoso (BRASIL, 2012). Este queijo tem importância econômica significativa para a indústria, principalmente pelo processo de elaboração ser considerado relativamente simples, aliado ao uso de equipamentos tradicionais, apresentar elevado rendimento, possibilitando um retorno rápido do investimento aos produtores e, conseqüentemente, custos menores para os consumidores

(ROSSI et al., 1998; FURTADO, 1999). A produção deste queijo está localizada principalmente no sul e sudeste do Brasil (SOUZA et al., 2008).

De coloração branca, consistência branda e macia, textura fechada com olhaduras mecânicas irregulares e de sabor levemente suave a ácido, o queijo Minas Frescal é apresentado ao consumidor em formato cilíndrico, entre 0,3 a 5,0 kg (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004). É caracterizado como fresco, não maturado, para consumo imediato, pois apresenta alta atividade de água, pH próximo de 5,0, baixo teor de sal e não é utilizado conservante na sua fabricação, resultando em um produto de vida de prateleira reduzida (SOUZA; SAAD, 2009). O processo de obtenção do queijo Minas Frescal ocorre através da coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997). Nesse tipo de elaboração de queijo, a ação das enzimas no leite resulta na desestabilização das micelas de caseína, dessa forma, as caseínas são retidas no coágulo e as proteínas do soro são drenadas para a fase aquosa, o soro (CHROMIK et al., 2010).

Ribeiro, Simões e Jurkiewicz (2009) explicam que a produção do queijo Minas Frescal é disseminada por todo o país e, portanto, tem considerável variação no padrão. Já Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) constataram que a composição e a qualidade do queijo Minas Frescal estão associadas diretamente ao processo de elaboração. Sabe-se que a fabricação dos queijos está relacionada às tradições locais, regionais e nacionais levando a diferenças entre queijos de uma mesma variedade e de diferentes origens (KAROUI; DE BAERDEMAEKER, 2007). No entanto, vários autores (CRUZ; GOMES; 2001; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006; SANGALETTI et al., 2009; VISOTTO et al., 2011; FERREIRA et al., 2011) evidenciaram a falta de padronização do queijo de Minas Frescal, no que se refere aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos e Visotto et al. (2011) sugerem que a qualidade do queijo Minas Frescal comercializada seja melhorada por meio de fiscalização e a conscientização dos fabricantes, quanto à seleção rigorosa do leite, bem como através da reavaliação das condições de fabricação, distribuição, comercialização e de prazo de validade.

Apesar da falta de padronização evidenciada por alguns autores, o Regulamento de Identidade e Qualidade deste produto define alguns parâmetros de qualidade e classifica o queijo Minas Frescal quanto ao teor de gordura como um 'queijo semigordo' e, portanto, deve apresentar teor de gordura no extrato seco entre 25 a 44,9% (BRASIL,

1997) e quanto à umidade, como um ‘queijo de muito alta umidade’, devendo apresentar umidade não inferior a 55% (BRASIL, 2004).

A elaboração da Ricota é uma opção para o aproveitamento do soro de leite resultante da fabricação do queijo Minas Frescal (ESPER; BONETS; KUAYE, 2007; EL-SHEIKH; FARRAG; ZAGHLOUL, 2010; PRUDÊNCIO et al., 2014). Entretanto, apesar do soro de leite ser considerado o produto secundário da produção de queijos, apresenta importantes constituintes como proteínas e peptídeos (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina sérica bovina, lactoferrina, entre outros), lactose, vitaminas e minerais, sendo que a sua composição é dependente do processo de elaboração do queijo (OUTINEN; HEINO; UUSI-RAUVA, 2010). A utilização de soro de leite atualmente é bastante diversificada como suplementos alimentares e bebidas principalmente pelas excelentes propriedades funcionais e nutricionais de suas proteínas (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001; CATTANEO et al., 2013).

A Ricota, ou “queijo recozido”, é um queijo originalmente produzido no sul da Itália e posteriormente difundido pelo próprio território italiano e para outros países (KOSIKOWSKI, 1982). Apresenta alta umidade e vida de prateleira limitada sob-refrigeração (HOUGH et al., 1999; MODLER; EMMONS, 2001; DI PIERRO et al., 2011), além de apresentar baixo rendimento na produção, em média cerca de 6 % (KOSIKOWSKI, 1982). Este produto também é conhecido por queijo de albumina, por se constituir basicamente desta proteína e de lactoglobulina, que são os principais componentes proteicos do soro e que não são coaguláveis pelo coalho, além de serem facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor e pela acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (MODLER, 1988; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). No entanto, Pizzillo et al. (2005) afirmam que tradicionalmente, este produto tem sido preparado pelo aquecimento de soro ou misturas de soro e leite, pois a adição de leite integral torna a Ricota macia e cremosa com textura adequada. No Brasil, de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, a adição de até 20 % de leite sob o volume inicial de soro é permitida para a elaboração da Ricota (BRASIL, 1952).

O consumo de Ricota no Brasil tem crescido na última década principalmente pela tendência dos consumidores em incorporar alimentos saudáveis na sua dieta, já que este produto apresenta baixo teor de gordura e proteínas de alta digestibilidade (RIBEIRO et al., 2005; ESPER; BONETS; KUAYE, 2007; CHR. HANSEN, 2008). Além disso, para as empresas que produzem queijos, a produção de

Ricota é uma alternativa econômica para a utilização de soro de leite, já que a eliminação do soro está relacionada a importante perda de nutrientes e problemas ambientais, tendo em vista suas altas demandas biológica e química de oxigênio (MADUREIRA et al., 2005; EL-SHEIKH; FARRAG; ZAGHLOUL, 2010).

A Ricota possui algumas características sensoriais semelhantes às do Queijo Minas, pois é um produto de cor branca ou branco-creme; crosta rugosa, não formada ou pouco nítida; textura fechada ou com algumas olhaduras mecânicas e é apresentada comercialmente em formato cilíndrico, em unidades entre 0,3 kg a 1,0 kg (BRASIL, 2006). No entanto, o queijo Minas Frescal e a Ricota apresentam, além das diferenças de matéria-prima e de processo de elaboração, diferenças na composição centesimal, como pode ser observada na Tabela 1 (TACO, 2011).

Tabela 1. Composição físico-química do queijo Minas Frescal e Ricota.

	Queijo Minas Frescal	Ricota
Calorias (kcal/100 g)	264	140
Umidade (g/100g)	56,1	73,6
Proteína (g/100g)	17,4	12,6
Carboidratos (g/100g)	3,2	3,8
Lipídios (g/100g)	20,2	8,1
Cálcio (mg/100 g)	579	253

Fonte: TACO (2011).

1.2 Propriedades físicas dos queijos

A aceitação pelos consumidores de um produto alimentício como o queijo depende diretamente da sua aparência, sabor e textura, e que por sua vez são originadas de uma combinação de fatores microbiológicos, bioquímicos e tecnológicos (PEREIRA; GOMES; MALCATA, 2009).

A textura do queijo é uma das mais importantes características para a definição da identidade e aceitabilidade do produto, pois é principalmente através dessa propriedade que os consumidores identificam e julgam cada variedade (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; TUNICK, 2000, O'CALLAGHAN; GUINEE, 2004), antes mesmo de o sabor ser avaliado (KANAWJIA et al., 1995). Além disso, este é o critério mais comum para a classificação dos queijos (FOX; MCSWEENEY, 2004).

Meilgaard, Civille e Carr (2007) definem textura como a manifestação sensorial da estrutura ou composição interna dos produtos de acordo com sua reação à tensão, que resultam nas propriedades mecânicas. Foegeding e Drake (2007) citam que a textura do queijo é geralmente limitada às sensações experimentadas durante o processo de mastigação, sugerindo o papel preponderante das propriedades mecânicas. No entanto, além da força e deformação, que ocorrem na mastigação, outros processos, tais como a manipulação da massa através da mistura com a língua e também, com a saliva ocorre e resulta em percepções únicas de textura, que não podem ser avaliadas através de medidas instrumentais (FOEGEDING; DRAKE, 2007).

Segundo Hort e Le Grys (2001), os atributos de textura são a manifestação das propriedades reológicas da estrutura física de um alimento e o estudo dessas propriedades tem-se mostrado útil em diferentes tipos de queijo (MADSEN; ARDÖ, 2001; SAN MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 2007; EVERETT; AUTY, 2008; LU; SCHMITT; CHEN, 2010; TUNICK; VAN HEKKEN, 2010). Konstance e Holsinger (1992) citam que a caracterização reológica é uma importante ferramenta na determinação de textura dos queijos e no estudo das variações desta em decorrência de modificações na composição, nas técnicas de processamento e nas condições de armazenagem. Além disso, Kulmyrzaev et al. (2005) cita que a caracterização dos queijos pode ainda fornecer informações úteis para determinação de parâmetros de qualidade desse produto. Everett e Auty (2008) ainda citam que as propriedades reológicas, como um método para quantificar a textura, depende das quantidades relativas e as extensões de interação entre as unidades estruturais de queijo.

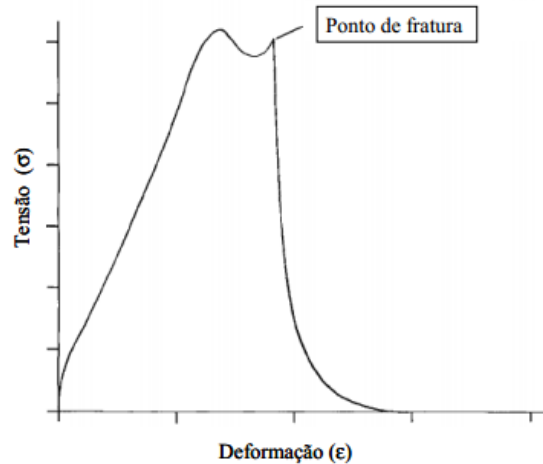
De acordo com Shoemaker et al. (1992), a avaliação das propriedades reológicas dos queijos é tão importante quanto à avaliação do sabor e aroma. Além disso, as propriedades reológicas dos queijos são função de sua composição, microestrutura (arranjo estrutural de seus componentes), do estado físico-químico e das interações de seus componentes e de sua macroestrutura (presença de olhaduras, fissuras, entre outros). A variação nestes parâmetros pode promover alterações significativas no comportamento reológico do queijo (FOX et al., 2000).

As características reológicas dos queijos são avaliadas através de testes que envolvem a aplicação de tensão em condições experimentais definidas, e na prática, semelhantes tensões são aplicadas ao queijo durante o processamento e durante o consumo. Dessa forma, o estudo das propriedades reológicas do queijo é de significativa

importância para o fabricante e para o consumidor (O'CALLAGHAN; GUINEE, 2004).

A caracterização reológica é essencialmente uma medida das propriedades mecânicas do queijo quando submetido a diferentes condições de força e tensão pelo tempo e testes de compressão são frequentemente utilizados para a avaliação desse produto (FOEGEDING et al., 2003; KULMYRZAEV et al., 2005). O teste de compressão uniaxial é um teste de deformação que consiste na submissão da amostra à compressão entre duas placas, sob velocidade constante, num determinado tempo, até a total deformação (CHARALAMBIDES et al., 2001), e este tipo de teste auxilia na determinação das propriedades de fratura do material (MESSENS et al., 2000; FOEGEDING; DRAKE, 2007; PAPPA; KANDARAKIS; MALLATOU, 2007). A Figura 1 apresenta um exemplo de curva típica do comportamento de queijo submetido ao teste de compressão uniaxial e pode-se perceber a ocorrência do início da deformação da estrutura interna do produto até a total ruptura. A partir dessa curva podem ser obtidas informações sobre a deformação de ruptura (ε) que descreve a deformabilidade do queijo antes da ruptura do produto e altos valores indicam grande deformabilidade, além de informações a respeito da tensão de ruptura (σ), que retrata a força requerida para a ruptura da amostra, sendo que altos valores numéricos indicam material mais resistente à fratura, ou seja, queijos mais duros (TUNICK, 2000). De acordo com Fox et al. (2000), estas propriedades estão correlacionadas com os parâmetros sensoriais elasticidade e firmeza dos queijos, respectivamente.

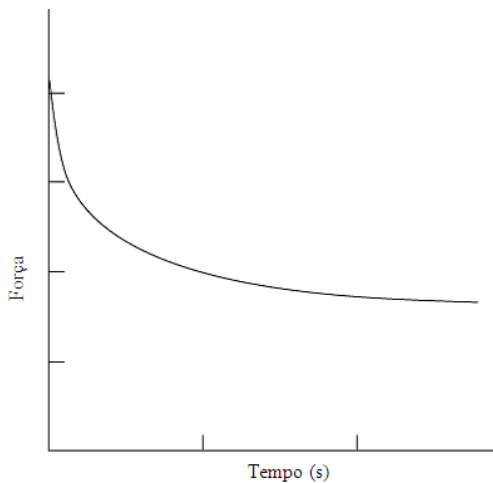
Figura 1. Exemplo de curva de força x deformação obtida na análise de compressão uniaxial de queijo.



Fonte: Tunick (2000).

Outro teste reológico utilizado para avaliar o comportamento viscoelástico dos alimentos, incluindo queijos, é o ensaio de relaxação (DIMITRELI; THOMAREIS, 2007), que fornece informações relacionadas à estrutura molecular desses produtos (SHOEMAKER et al., 1992; FOEGEDING; DRAKE, 2007). Esse teste é baseado na submissão do queijo à deformação constante por um determinado tempo dentro da faixa viscoelástica do produto, sem a ocorrência de ruptura (KONSTANCE; HOLSINGER, 1992; BERTOLA et al., 2000) e um exemplo de curva obtida nesse teste pode ser observada na Figura 2. Após a normalização e análise dos resultados utilizando modelos matemáticos, informações do grau de solidez e da taxa inicial de decaimento da força dos queijos podem ser obtidas (PELEG; NORMAND, 1983). Alguns modelos têm sido propostos para a predição dos parâmetros de viscoelasticidade a partir das curvas de relaxação experimentais. Tradicionalmente, são utilizados modelos matemáticos como de Maxwell e de Peleg (RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009).

Figura 2. Exemplo de curva de força x tempo obtida em teste de relaxação de queijo.



Fonte: Bertola et al. (2000).

Os queijos são considerados materiais viscoelásticos, pois durante (e após) a etapa de deformação, parte da energia mecânica fornecida é armazenada no material (parte elástica) e parte é dissipada (parte viscosa) (KONSTANCE; HOLSINGER, 1992; LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003), contudo, devido às variações nas condições de fabricação e composição, diferentes variedades de queijos apresentam diferentes comportamentos reológicos, que vão desde o comportamento viscoso para o queijo macio e comportamento elástico para queijos duros (O'CALLAGHAN; GUINEE, 2004). A viscoelasticidade dos queijos resulta da contribuição individual e da interação entre seus constituintes, como a proteína, gordura, minerais e a água (FOX et al., 2000).

Outro importante atributo usado para a avaliação da qualidade dos alimentos e considerado pelos consumidores na escolha e identificação dos produtos é a cor (ROHM; JAROS, 1996; RUDAN et al., 1998; DELWICHE, 2004; PINHO et al., 2004). Esse atributo está relacionado com a estrutura física e natureza química do alimento, e para os queijos, é específica para cada variedade (KAYA, 2002).

A percepção de cor difere entre os indivíduos e depende, entre outros fatores, de mudanças na iluminação, tornando assim uma determinação subjetiva e bastante variável. Por essa razão, o uso de sistemas instrumentais de medidas da cor é recomendado (LÉON et al., 2006). Para a avaliação instrumental da cor de queijos normalmente utiliza-se colorímetro triestímulo (X, Y e Z) que localiza a cor como um ponto no espaço tridimensional e dessa forma fornece informações objetivas e bem definidas (El-NIMR et al., 2010). Esta técnica não só

fornece informações básicas sobre a coloração, mas também permite um controle preciso da qualidade dos alimentos (KNEIFEL; ULBERTH; SCHAFFER, 1992).

Em 1976, a *Commission Internationale d'Eclairage* (CIE) recomendou o uso da escala de cor CIE $L^*a^*b^*$, ou CIELAB para a medida de cor de diferentes produtos (Figura 3). Nesta escala, o eixo L^* varia do mínimo, representado pelo preto (0) ao máximo, representado pelo branco (100). Os eixos a^* e b^* não apresentam limites numéricos específicos, porém o eixo a^* indica coloração do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$), enquanto o eixo b^* indica coloração do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$) (HUNTERLAB, 2012).

Atualmente, a avaliação instrumental de cor de queijos tem sido escolhida por vários autores (BUFFA et al. 2001; PINHO et al., 2004; CUNHA; DIAS; VIOTTO, 2010; El-NIMR et al. 2010; FRITZE-FREIRE et al., 2010; DELGADO et al., 2011; VOIGT et al., 2012) principalmente para a avaliação de produtos elaborados em laboratório a fim de investigar as variações durante o período de maturação ou pelos tratamentos tecnológicos aplicados. No entanto, Wadhvani e McMahon (2012) afirmam que a análise da cor dos queijos pode também ser usada para amostras comerciais a fim de monitorar a uniformidade dos produtos, pois os consumidores geralmente associam a coloração a outras características do queijo, como o sabor e assim, influenciando na decisão de compra.

Figura 3. Coordenadas para medida instrumental da cor pelo sistema CIELAB.



Fonte: Hunterlab (2012).

1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial, sendo a mobilidade eletroforética da molécula ou partícula carregada influenciada, entre outros fatores, pela carga, pela massa molecular e pela concentração da mesma (WESTERMEIER, 2005).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é um método de separação clássico, que com a ajuda de técnicas de digitalização e análise de imagens, permite a quantificação das bandas dos géis, e assim, fornece boa separação, alta resolução e precisa quantificação, levando a resultados precisos e reprodutíveis (LIN et al., 2010). Além disso, apresenta vantagens de ser uma técnica de separação de fácil execução, rápida e de baixo custo (AMIGO et al., 1990).

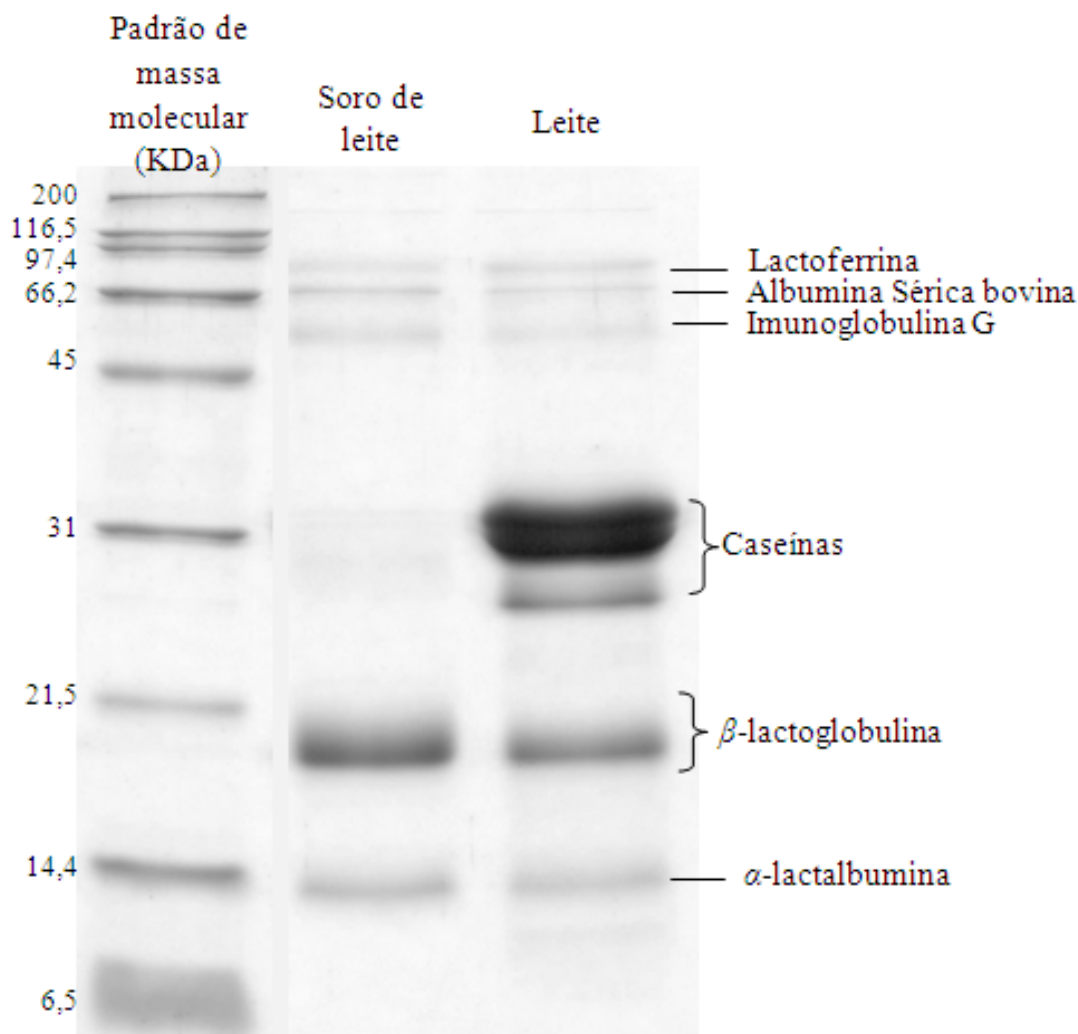
A PAGE na presença do desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) é uma técnica bastante utilizada no estudo de proteínas para a determinação da massa molecular ou tamanho das proteínas e é capaz de separar essas moléculas de tamanhos moleculares entre 5-150 kDa em um único gel (CONSIDINE et al., 2007). A incubação das amostras proteicas com SDS e um agente redutor, como o β -mercaptoetanol, que promove o rompimento das ligações dissulfeto das proteínas facilitando o acesso do SDS, conduz a uma normalização da carga e da forma das

proteínas, de modo que o elemento de distinção entre essas moléculas passa a ser a massa molecular (SILVA JUNIOR, 2001). A maioria das proteínas apresenta mobilidade em tampão contendo SDS e o uso desta técnica permite a determinação das massas moleculares de proteínas através da relação linear existente entre o logaritmo de massas moleculares conhecidas (padrão) e a mobilidade eletroforética das mesmas (WESTERMEIER, 2005).

A SDS-PAGE é ainda uma importante técnica utilizada para a separação, identificação e quantificação de proteínas do leite (GALINDO-AMAYA; VALBUENA-COLMENARES; ROJAS-VILLARROEL, 2006; JOVANOVIC et al., 2007; HOLLAND et al., 2010). Meisel e Carstens (1989) afirmam que SDS-PAGE é um método apropriado para a determinação dos teores de caseínas e proteínas do soro em produtos lácteos e de acordo com Strange et al. (1992), essa técnica, associada a padrões de massa molecular e análise de densitometria, pode ser um método de escolha para atividades de monitoramento, especialmente quando há suspeita de adulterações.

A identificação das proteínas separadas por SDS-PAGE pode ser realizada pela comparação da sua mobilidade no gel e da massa molar de proteínas padrão, como pode ser observado na Figura 4, assim como pela comparação de eletroferogramas de estudos prévios (JOVANOVIC et al., 2007; HERNÁNDEZ; HARTE 2009; HOLLAND et al., 2010). As proteínas têm sido amplamente utilizadas como espécies marcadoras de autenticidade em produtos lácteos através de diferentes técnicas de análise como a eletroforese (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008).

Figura 4. Perfil eletroforético de leite e soro de leite e a identificação das principais proteínas constituintes desses produtos.



Fonte: Elaborada pelo autor (2014).

1.4 Autenticidade de produtos lácteos

A autenticidade dos alimentos atualmente está sendo um assunto de interesse para pesquisadores, consumidores, legisladores e em todos os níveis do processo de produção (DE LA FUENTE; JUAREZ, 2005; AQUINO et al., 2014), seja por razões econômicas, legais, práticas religiosas ou de saúde pública (VELOSO et al., 2002; PRIMROSE; WOOLFE; ROLLINSON, 2010).

O leite está entre os sete alimentos que mais sofrem adulterações (MOORE; SPINK; LIPP, 2012) e nesse contexto, os produtos lácteos são de particular interesse, pois são um grupo de alimentos que desempenham um papel importante na alimentação da

população e são essenciais para certos grupos de consumidores (mulheres, crianças e idosos) (DE LA FUENTE; JUAREZ, 2005). Na indústria láctea, as adulterações comerciais geralmente envolvem a substituição de leites de alto valor agregado por matérias-primas de custo menor e/ou de baixa qualidade (WOOLFE; PRIMROSE, 2004; OANCEA, 2009).

O aumento da consciência dos consumidores acerca da composição dos alimentos tem resultado na necessidade de reavaliar as informações contidas nas embalagens de forma que oriente na escolha dos alimentos (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008) e segundo De La Fuente e Juárez (2005) uma matéria-prima ou produto final autênticos devem fornecer informações na rotulagem, principalmente em termos de ingredientes, tecnologia de produção e identidade genética. Rodríguez et al. (2010) afirmam que os queijos devem ser corretamente rotulados, e a substituição ou a omissão de componentes nos produtos lácteos por ingredientes de menor custo, a adição de ingredientes com o intuito de fazer os produtos parecerem melhores, e falsa ou ausência de informações na rotulagem é considerada fraude.

As principais investigações envolvendo a autenticidade de queijos dizem respeito à espécie de origem do leite utilizado na elaboração desses produtos (CARTONI et al., 1999; MOATSOU et al., 2004; COLAK et al., 2006; HURLEY et al., 2006; CZERWENKA; MULLER; LINDNER, 2010; RODRÍGUEZ et al., 2010; PESIC et al., 2011; GANOPOULOS et al., 2013; GUERREIRO et al., 2013).

Rodríguez et al. (2010) citam que para a prevenção de adulterações e a proteção das indústrias e consumidores torna-se necessário controlar se os tipos de leite usados na elaboração dos produtos correspondem com o que aparece na declaração da rotulagem e a partir disso, em concordância com Santos, Pereira-Filho e Rodriguez-Saona (2013) torna-se indispensável dispor de métodos adequados, eficientes, rápidos e de baixo custo para análise e identificação dessas adulterações.

O principal objetivo da investigação da autenticidade dos alimentos é a identificação de marcadores ou grupos de marcadores para a caracterização da autenticidade ou de seus potenciais adulterantes/contaminantes e utilizá-los para a identificação de problemas de autenticidade (GUERREIRO et al., 2013). As proteínas têm sido amplamente utilizadas como espécies marcadoras de autenticidade em produtos lácteos através de diferentes técnicas de análise como a eletroforese, cromatografia, espectrometria e ensaios imunológicos (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008).

1.5 Validação de metodologias e métodos qualitativos

É internacionalmente reconhecido que a validação dos métodos é necessária em laboratórios analíticos. O uso de métodos validados é importante para o laboratório analítico demonstrar sua qualificação e competência (TAVEINIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

A validação é indispensável para uma nova metodologia de análise e está relacionada a um sistema analítico particular, ou seja, o método deve ser hábil na resolução de um problema analítico particular (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002). É uma ferramenta usada para demonstrar que um método analítico específico mede o que pretende medir e responde adequadamente ao propósito pelo qual foi desenvolvido (TAVEINIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; CHANDRAN; SINGH, 2007). Dessa forma, a revalidação é necessária quando qualquer componente do sistema analítico é modificado ou se houver indicações de que o método não está respondendo adequadamente ao objetivo proposto (EURACHEM, 1998).

Vários guias e regulamentos acerca dos procedimentos de validação de métodos são descritos por agências de regulação, comitês e grupos de trabalho (TAVEINIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004). No entanto, de acordo com Chandran e Singh (2007) ainda há discordâncias entre esses documentos em diferentes pontos do processo de validação.

Os parâmetros de desempenho dependem do tipo do método e de suas características. A classificação convencional diferencia entre métodos qualitativos e quantitativos (TRULLOLS SOLER, 2006). A validação de métodos qualitativos ainda não está tão bem desenvolvida como a validação para métodos quantitativos, apesar da utilização de métodos qualitativos não ser atual (CÁRDENAS; VALCÁRCEL, 2005; ELLISON; FEARN, 2005; TRULLOLS et al., 2005). A European Community (2002) define os métodos qualitativos como “a avaliação da presença ou ausência de um ou mais analitos em uma amostra pela avaliação das suas propriedades físicas e químicas”, enquanto a Association of Official Analytical Chemists (AOAC International) (FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002) define os métodos qualitativos como “um método de análise cuja resposta está relacionada à presença ou ausência de um analito, detectado diretamente ou indiretamente em certa quantidade de amostra”. Trullols, Ruisánchez e Rius (2004) e Ellison e Fearn (2005) citam que a partir das definições acerca dos métodos analíticos qualitativos, estes são utilizados para

investigar se uma amostra contém um ou mais analitos e o resultado dessa análise pode ser binário: presença/ausência ou sim/não.

Trullols, Ruisánchez e Rius (2004) reforçam que a presença ou ausência de um analito não é considerada uma medida absoluta relacionada a uma concentração no nível zero, mas um nível de concentração específico, pois abaixo desse nível limitante a concentração de um analito é considerada insignificante. Estes autores ainda citam que a detecção do analito pode requerer uma resposta instrumental, mas a partir da resposta obtida, o resultado é convertido em sim/não ou presença/ausência.

Quando uma resposta instrumental é usada para decidir se um analito está acima ou abaixo de uma concentração analítica, a resposta da amostra-teste é comparada com a resposta advinda de uma amostra-referência, esta obtida de um material de referência, que é medida e será utilizada para comparar com a resposta da amostra-teste. Se a amostra-teste apresentar resultado maior que a amostra-referência, pode-se concluir que a amostra-teste contém o analito em concentração maior do que a amostra referência. No entanto, se a amostra-teste for menor que a amostra-referência, conclui-se que a amostra-teste contém menos analito que a amostra-referência. Dessa forma, a resposta instrumental é convertida em uma resposta binária do tipo sim/não (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004).

Referências

ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 187-192, 2001.

AMIGO, L. et al. Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1482-1490, 1991.

AQUINO, L. F. M. C. et al. Identifying cheese whey an adulterant in milk: Limited contribution of a sensometric approach. **Food Research International**, v. 62, p. 233-237, 2014.

BERTOLA, N. C. et al. Effects of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 2, p. 207-214, 2000.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção, Industrialização e Comercialização (Indústria) - **Produção Brasileira de queijo**. Disponível em http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tab_ela0424.php. Acesso em: maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento RIISPOA. Decreto 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem Animal. Brasília, DF: **Diário Oficial da União**, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n° 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 4, de 01 de março de 2004. Altera o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2006.

BUFFA, M. N. et al. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 927-934, 2001.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279–1288, 2005.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 477-487, 2005.

CARTONI, G. et al. Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. **Journal of Chromatography A**, v. 846, n. 1, p. 135-141, 1999.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262-267, 2007.

CATTANEO, T. M. P. et al. Behavior of Aflatoxin M1 in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 77-82, 2013.

CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 4-14, 2007.

CHARALAMBIDES, M. N. et al. The analysis of the frictional effect on stress-strain data from uniaxial compression of cheese. **Journal of Materials Science**, v. 36, n. 9, p. 2313-2321, 2001.

CHR. HANSEN. Ricota – Aspectos tecnológicos relevantes. **Ha-la Biotec**, n° 105, out/nov/dez, 2008.

CHROMIK, C. et al. Adjustment of vat milk treatment to optimize whey protein transfer into semi-hard cheese: a case study. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p. 496–503, 2010.

COLAK, H. et al. Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. **Food control**, v. 17, n. 11, p. 905-908, 2006.

CONSIDINE, T. et al. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments – A Review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 1-23, 2007.

CRUZ, C. D.; GOMES, M. I. F. V. Lipid level evaluation in industrialized and handmade minas frescal cheese and ricottas from the region of Botucatu/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 109–112, 2001.

CUNHA, C. R.; DIAS, A. I.; VIOTTO, W. H. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. **Food Research International**, v. 43, p. 723–729, 2010.

CZERWENKA, C.; MÜLLER, L.; LINDNER, W. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of β -lactoglobulin variants. **Food Chemistry**, v. 122, p. 901-908, 2010.

DE LA FUENTE, M. A.; JUAREZ, M. Authenticity assessment of dairy products. **Critical Review in Food Science**, v. 45, p. 563-585, 2005.

DELGADO, F. J. et al. Proteolysis, texture and colour of a raw goat milk cheese throughout the maturation. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 3, p. 483-488, 2011.

DELWICHE, J. The impact of perceptual interactions on perceived flavor. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 2, p. 137-146, 2004.

DI PIERRO, P. et al. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 368–374, 2008.

EL-BAKRY, M.; SHEEHAN, J. Analyzing cheese microstructure: A review of recent developments. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 84-96, 2014.

ELLISON, S. L. R.; FEARN, T. Characterizing the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 468-476, 2005.

EL-NIMR, A. A. et al. Water activity, color characteristics and sensory properties of Egyptian Gouda cheese during ripening. **Journal of American Science**, v. 6, p. 447-453, 2010.

EL-SHEIKH, M.; FARRAG, A.; ZAGHLOUL, A. Ricotta cheese from whey protein concentrate. **Journal of American Science**, v. 6, n. 8, p. 321-325, 2010.

ESPER, L. M.; BONETS, P. A.; KUAYE, A. Y. Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 299-304, 2007.

EURACHEM, Guide. The fitness for purpose of analytical methods. **A laboratory guide to method validation and related topics**, 1998.

Disponível em:

<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>. Acesso em: junho 2013.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No. 273/2008 of 5 march 2005 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) N° 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. **Official Journal of the European Union**, L 81/53, 2008.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A. E. Cheese structure and current methods of analysis. **International Dairy Journal**, v.18, n. 7, p.759-773, 2008.

FAGUNDES, M.H. **Perspectivas para a agropecuária na safra 2013/2014 - Lácteos**. setembro 2013. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_12_17_50_23_10_lacteos.pdf. Acesso em: abril de 2014.

FARRELL JUNIOR, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, 2002.

FERREIRA, R. M. et al. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, n. 5, 2011.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Sensory and mechanical properties of cheese texture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1611-1624, 2007

FOEGEDING, E.A. et al. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 8, p. 585-591, 2003.

FOX, P. F.; COGAN, T. M. **Factors that affect the quality of cheese**. In P. F. FOX; P. L. H. MCSWEENEY; T. M. COGAN; T. P. GUINEE (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.

FOX, P. F. et al. **Cheese rheology and texture**. In P. F. FOX; T. P. GUINEE; T. M. COGAN; P. L. H. MCSWEENEY (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 587 p.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P. L. H. **Cheese: An Overview**. In P. F.

FOX; P. L. H. MCSWEENEY; T. M. COGAN; T. P. GUINEE (Eds.), Cheese: chemistry, physics and microbiology, 3. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Dairy Journal**, v. 63, p. 561-568, 2010.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of minas frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 621–627, 2010b.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1999.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar. (1994).

GALINDO-AMAYA, L. M.; VALBUENA-COLMENARES, E.; ROJAS-VILLARROEL, E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Revista Científica**, v. 16, n. 003, 2006.

GANOPOULOS, I. et al. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 835-840, 2013.

GUERREIRO, J. S. et al. Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3, p. 1526-1532, 2013.

HERNÁNDEZ, A.; HARTE, F. M. Isolation of caseins from whey proteins by microfiltration modifying the mineral balance in skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5357-5362, 2009.

HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal**, 11, 495-503.

HOLLAND, B. et al. Separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 893–900, 2010.

HORT, J.; LE GRYS, G. Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4, p. 475-481, 2001.

HOUGH, G. et al. Sensory and microbiological shelf-life of a commercial ricotta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 454-459, 1999.

HUNTERLAB, Application Note AN 1005.00. **Measuring color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L*a*b***, 2012. Disponível em: www.hunterlab.com. Acesso em: setembro 2012.

HURLEY, I. P. et al. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 805-812, 2006.

JOVANOVIC, S. et al. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. **Sensors**, v. 7, n. 3, p. 371–383, 2007.

KANAWJIA, S. K. et al. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 6, p. 577-583, 1995.

KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, v. 102, p. 621-640, 2007.

KAYA, S. Effect of salt on hardness and whiteness of Gaziantep cheese during short-term brining. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 2, p. 155-159, 2002.

KNEIFEL, W.; ULBERTH, F.; SCHAFFER, E. Tristimulus colour reflectance measurement of milk and dairy products. **Le Lait**, v. 72, n. 4, p. 383-391, 1992.

KONSTANCE, R. P.; HOLSINGER, V. H. Development of rheological test methods for cheese. **Food Technology**, v. 46, n. 1, p. 105–109, 1992.

KOSOKOWSKI, F.V. Characteristics of cottage cheese from water and permeate reconstituted retentates. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 9, p. 1705-1714, 1982.

KULMYRZAEV, A. et al. Investigation at the molecular level of soft cheese quality and ripening by infrared and fluorescence spectroscopies and chemometrics-relationships with rheology properties. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6, p. 669-678, 2005.

LAW, B. A.; TAMIME. A. Y. (Eds.) **Technology of Cheesemaking**. 2 ed. Wiley Blackwell, 2010.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 8, p. 1748-1760, 1987.

LEON, K. et al. Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. **Food Research International**, v. 39, n. 10, p. 1084-1091, 2006.

LIN, S. et al. Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. **Food chemistry**, v. 121, n. 3, p. 803-808, 2010.

LU, X.; SCHMITT, D.; CHEN, S. Effect of sesame protein isolate in partial replacement of milk protein on the rheological, textural and microstructural characteristics of fresh cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 7, p. 1368-1377, 2010.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2725– 2743, 2003.

MADSEN, J. S.; ARDÖ, Y. Exploratory study of proteolysis, rheology and sensory properties of Danbo cheese with different fat contents. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4, p. 423-431, 2001.

MADUREIRA, A. R. et al. Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. 160-165, 2005.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research Technology**, v. 227, p. 649-665, 2008.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3.ed., Boca Raton: CRC Press, 387 p., 2007.

MEISEL, H.; CARSTENS, J. Comparative studies on the determination of the whey protein and casein content in dairy products by means of the casein phosphorus method, SDS-electrophoresis and polarography. **Milchwissenschaft**, v. 44, n. 5 p. 271-276, 1989.

MESSENS, W. et al. Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5, p. 359-367, 2000.

MOATSOU, G. et al. Detection of caprine casein in ovine Halloumi cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 3, p. 219-226, 2004

MODLER, H. W. Development of a continuous process for the production of ricotta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2003-2009, 1988.

MODLER, H. W.; EMMONS, D. B. The use of continuous ricotta processing to reduce ingredient cost in 'further processed' cheese products. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4, p. 517-523, 2001.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 118-126, 2012.

MORR, C.V.; HA, Y.W. Whey proteins concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 33, n. 6, p. 431- 476, 1993.

NALDINI, M. C. M.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct acidification or lactic culture during refrigerated storage.

International Journal Dairy Technology, v. 62, p. 361-365, 2009.

O'CALLAGHAN, D. J.; GUINEE, T. P. **Rheology and texture of cheese**. In P. F. FOX, P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3. ed., p. 511–540. London: Elsevier Academic Press, 2004.

OANCEA, S. Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. **Romanian Biotechnology Letters**, v. 14, n. 1, p. 4146-4151, 2009.

OUTINEN, M.; HEINO, A.; UUSI-RAUVA, J. Pre-treatment methods of Edam cheese Milk. Effect on the whey composition. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 647-654, 2010.

PAPPA, E.C.; KANDARAKIS, I.; MALLATOU, H. Effect of different types of milks and cultures on the rheological characteristic of Teleme cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 143-149, 2007.

PELEG, M.; NORMAND, M. D. Comparison of two methods for stress relaxation data presentation of solid foods. **Rheologica Acta**, v. 22, n. 1, p. 108-113, 1983.

PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P; MALCATA, F. X. Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 5, p. 213-219, 2009.

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

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. S. F. Minas frescal cheese with soy product: physical, chemistry and sensorial characteristics. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 77–85, 2010.

- PINHO, O. et al. Chemical, physical, and sensorial characteristics of “terrincho” ewe cheese: changes during ripening and intravarietal comparison. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, p. 249–257, 2004.
- PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001.
- PIZZILLO, M. et al. Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 33-40, 2005.
- PLANZER JUNIOR, S. B. et al. Food Safety Knowledge of Cheese Consumers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 28-30, 2009.
- PRIMROSE, S.; WOOLFE, M.; ROLLINSON, S. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. **Trends Food Science Technology**, v. 21, p. 582-590, 2010.
- PRUDÊNCIO, E. S. et al. Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. **Food Research International**, v. 56, p. 92-99, 2014.
- RIBEIRO, A. C. et al. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 113-117, 2005.
- RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2009.
- ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Conditions of production and distribution of minas fresh cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.
- RODRÍGUEZ, N. et al. Analysis of protein chromatographic profiles joint to partial least squares to detect adulterations in milk mixtures and cheeses. **Talanta**, v. 81, p. 255-264, 2010.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G.. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 202-206, 2009.

ROHM, H.; JAROS, D. Colour of hard cheese. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 203, n. 3, p. 241-244, 1996.

ROSSI, D. et al. Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na proteólise e durabilidade do queijo Minas frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 53, n. 302/303, p. 75-84, 1998.

RUDAN, M. A. et al. Effect of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality, and appearance of reduced fat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p. 2065-2076, 1998.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, M.F. et al. Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. **LWT- Food Science and Technology**, v. 40, p. 697–705, 2007.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 19-24, 2013.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHOEMAKER, C. F. et al. Rheological characterization of dairy products. **Food Technology**, v. 46, n. 1 p. 98-104, 1992.

SILVA JUNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico prático**. Interciência, 2001.

SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physicochemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT- Food Science and Technology**, v.42, p.633-640, 2009.

SOUZA, T. B. et al. Microscopic quality indicators of minas frescal cheese. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 71–75, 2008.

ST-GELAIS, D.; HACHÉ, S. Effect of β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. **Food Research International**, v. 38, n. 5, p. 523-531, 2005.

STRANGE, E. D. et al. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1, p. 81-102, 1992.

TACO – **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4.ed. rev e ampl. Campinas: UNICAMP – NEPA, 2011. 161 p. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: abril 2012.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TRULLOLS SOLER, E. **Validation of qualitative analytical methods**. Tese de Doutorado. Universitat Rovira i Virgili, 2006.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 137-145, 2004.

TRULLOLS, E. et al. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 516-524, 2005.

TUNICK, M. H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal of Dairy Science**, v.83, n. 8, p.1892-1898, 2000.

TUNICK, M. H.; VAN HEKKEN, D. L. Rheology and texture of commercial queso fresco cheeses made from raw and pasteurized milk. **Journal of Food Quality**, v. 33, n. 1, p. 204-215, 2010.

VELOSO, A. C. A. et al. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

VISOTTO, R. G. et al. Queijo minas frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.

VOIGT, D. D. et al. Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture and functionality of Cheddar cheese during ripening. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 23-30, 2012.

WADHWANI, R.; MCMAHON, D. J. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2336-2346, 2012.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**. Weinheim: John Wiley & Sons, 2005. 406 p.

WOOLFE, M.; PRIMROSE, S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 222-226, 2004.

CAPÍTULO 2

Avaliação reológica, físico-química e da autenticidade de queijos Minas Frescal

Artigo publicado:

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.;
STEPHAN, M. P.; SILVIO DO EGITO, A.; DAGUER, H. Rheological,
physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese.
Food Control, v. 45, p. 22-28, 2014.

Avaliação reológica, físico-química e da autenticidade de queijo Minas Frescal

Resumo

Este estudo foi realizado para avaliar as características físico-químicas (cor, umidade, proteína e gordura), as propriedades reológicas (tensão de ruptura, deformação de ruptura, grau de solidez e taxa de decaimento da força), bem como a autenticidade (através da SDS-PAGE) de 21 amostras comerciais de queijo Minas Frescal adquiridas da região sul do Brasil. Foi observada ampla variação entre as amostras, e uma tendência à coloração branca amarelada. Os teores de umidade e proteína influenciaram nas propriedades reológicas e os queijos mostraram uma tendência a serem viscosos e firmes. A SDS-PAGE revelou ampla e inesperada variabilidade nos perfis proteicos e na razão das proteínas caseína / β -lactoglobulina permitindo distinguir queijos autênticos dos adulterados. Os perfis proteicos sugerem a presença irregular de soro de leite na composição desses produtos, contrariando o processo enzimático legalmente requerido para a elaboração do queijo Minas Frescal. Esses resultados reforçam a necessidade de controle mais efetivo, principalmente na seleção de matéria-prima, com o objetivo de oferecer produtos autênticos aos consumidores.

Palavras-chave: Queijo Minas Frescal, Reologia, Cor, Perfil eletroforético, Autenticidade.

Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese

Abstract

This study was carried out to assess physicochemical (color, moisture, protein and fat content) and rheological properties (fracture stress, fracture strain, degree of solidity and stress decay), as well as to assess the authenticity (using SDS-PAGE) of Minas Frescal cheese in 21 commercial samples acquired in Southern Brazil. Large differences among the samples, which tended to present a yellowish white color were observed. Moisture and protein influenced on the rheological properties and cheeses showed a tendency to being viscous and firm. SDS-PAGE revealed a wide unexpected variability in their proteins profiles and a densitometric casein/ β -lactoglobulin ratio allowed to distinguish authentic cheese from adulterated ones. The profiles suggest the irregular presence of whey in the composition of these products, contrary to the enzymatic process legally required. These results emphasize the need for a more effective control, mainly in the selection of raw material, aiming to offer consumers authentic products.

Keywords: Minas Frescal cheese, Rheology, Color, Electrophoretic profile, Authenticity.

1 Introduction

The Minas Frescal is a genuine Brazilian cheese and it is the country's most widely consumed cheese type (PLANZER JUNIOR et al., 2009). It is produced mainly by small and medium-sized factories in the South and Southeast regions of Brazil. It is a fresh white cheese that has high moisture content, does not undergo maturation, is of short durability and has no preservatives (SOUZA et al., 2008). This cheese is produced with pasteurized milk through enzymatic coagulation by addition of rennet and/or other appropriate clotting enzymes, whether they are complemented or not by the action of a lactic acid starter culture (BRASIL, 1997). According to Brazilian regulation, Minas Frescal cheese can be presented in a cylindrical shape, weighing from 0.3 kg to 5.0 kg (BRASIL, 2006). It is officially classified a semi-fat and very high moisture cheese (BRASIL, 1997, BRASIL, 2004). In this conventional cheese-making process, the action of the clotting enzymes in milk results in the destabilization of the casein micelles. Therefore, the caseins are retained in the curd and whey proteins are expelled to the aqueous phase (whey) (CHROMIK et al., 2010).

The production process of Minas Frescal cheese is considered relatively simple and the use of traditional equipment and no need for maturation allow producers to have a quick investment return (FURTADO, 1999). However, consumers expect cheeses to be reproducible and consistent, with appropriate composition and quality, especially among those belonging to the same category (FOX; COGAN, 2004). Characterization of cheeses is also important for the protection of traditional diversity and for contributing to baseline data for quality control. Physicochemical and rheological methods, as well as the electrophoretic profile, are used to evaluate the quality of cheese (BRIGHENTI et al., 2008; FOEGEDING; DRAKE 2007; HOLLAND et al., 2010; PINHO et al., 2004).

Consumers and inspection authorities have been increasingly concerned about the authenticity of milk and dairy products. Brazilian regulation establishes a standard of identity and quality for Minas Frescal cheese; however, that regulation is limited to determine physicochemical characteristics, providing only regulatory limits for moisture ($> 55\text{g}/100\text{g}$) and fat in dry matter (between 25.0 and 44.9g/100g) (BRASIL, 1997). Several studies have contributed to assess the identity profile of the Minas Frescal cheese; however, they

were performed on cheeses made at pilot plants (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a; FRITZEN-FREIRE et al., 2010b; PIAZZON-GOMES; PRUDÊNPIO; SILVA, 2010), having insufficient or no studies whatsoever on different brands of commercial Minas Frescal cheese. Therefore, the aim of this study was to investigate the physicochemical and rheological properties, as well as the authenticity of commercial Minas Frescal cheese produced by different factories, aiming to assess the identity and quality parameters of this product.

2 Material and methods

2.1 Minas Frescal cheese samples

A total of 21 samples of commercial Minas Frescal cheese were purchased from different producers of Southern Brazil. According to the label, all samples were made with pasteurized milk, were properly packaged, identified and inspected by sanitary authority and kept under refrigeration in the display cases at supermarkets. The collected samples were transported to the laboratory in an isothermal container and kept under refrigeration until analysis.

2.2 Physicochemical analysis

Samples were analyzed for moisture (g/100g) by drying to constant weight at 105°C (AOAC, 2005), fat (g/100g) by Soxhlet extraction (IAL, 2005) and protein content (g/100g) by the Kjeldahl method ($N \times 6.38$) (AOAC, 2005). Fat in dry matter (g/100g) was calculated by Eq. (1) as following:

$$\text{Fat in dry matter (g/100g)} = \text{Fat} \times 100 / (100 - \text{Moisture}) \quad \text{Equation 1}$$

All analyses were carried out in triplicate and the chemicals used were of analytical grade.

2.3 Color analysis

The colorimeter Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) adjusted to operate with D65 illuminant and observation angle of 10° was used to evaluate the color of samples of

Minas Frescal cheeses. The parameters L^* (lightness, ranges 0 to 100), a^* (from green ($-a^*$) to red ($+a^*$)), and b^* (from blue ($-b^*$) to yellow ($+b^*$)) were measured using the CIElab color scale. The colorimeter was calibrated with a white standard plate and the measurements were performed in triplicate using the inner section of the cheeses immediately after unpacking.

2.4 Rheological properties

The rheological analyses (uniaxial compression and stress relaxation) were carried out using the TA.XT *plus* Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., texture exponent for Windows software, Surrey, UK) fitted with a 50 kg load cell and a 25 mm diameter aluminum probe. The samples were prepared by removing cylindrical pieces from the cheese (19 mm diameter; 20 mm height) which were then kept in refrigeration ($5\pm 1^\circ\text{C}$) until testing, without addition of any lubricants. All determinations were repeated five times.

2.4.1 Uniaxial compression

The cylindrical cheese samples were compressed to 50% of their height at a cross-head speed of 1 mm/s. The stress (σ) was calculated by Eq. (2), as proposed by Calzada and Peleg (1978).

$$\sigma_{(t)} = F_{(t)}/A \quad \text{Equation 2}$$

where $\sigma_{(t)}$ is the stress at time (t); $F_{(t)}$ is the force at time (t); $A_{(t)}$ is the area.

The strain (ε) was also calculated in accordance with Calzada and Peleg (1978), as shown in Eq. (3).

$$\varepsilon = \ln H_0/H_0 - \Delta_H \quad \text{Equation 3}$$

where H_0 is the original height; and ΔH is the change in height.

The fracture stress (σ) and fracture strain (ε) were derived in relation to the fracture point, defined as the local maximum of the stress-strain curve according to Wium and Qvist (1997).

2.4.2 Stress relaxation

The cheese samples were subjected to 10% compression for 10 min from the initial height of the sample for 60 s at a cross-head speed of 1 mm/s. The experimental results for the stress relaxation were normalized and analyzed through the empirical model proposed by Müller, Laurindo and Yamashita (2009) and Peleg (1980), where $F(t)$ is the force at time (t) and F_0 is the initial force, as shown in Eq. (4):

$$F(t)/F_0 = 1 - (c_1 \cdot t)/(c_2 + t) \quad \text{Equation 4}$$

The parameters c_1 and c_2 were estimated by non-linear regression using the STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). In this model, $1 - c_1$ and c_1/c_2 provided information about the viscoelastic characteristics of the material. The value of $1 - c_1$ can be seen as a “degree of solidity”, while the ratio c_1/c_2 represents the initial rate of the stress decay. The “degree of solidity” is associated with the global behavior of the material, thus all the experimental data were considered. In order to obtain a precise estimation of the initial decay rate, the data were adjusted using the first one hundred experimental points from the relaxation curve, without dimension through the ratio $F(t)/F_0$ versus time, as suggested by Müller, Laurindo and Yamashita (2009).

2.5 Authenticity assessment

Dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as originally proposed by Laemmli (1970), was used to assess the authenticity of Minas Frescal cheese samples. Cheese samples were freeze-dried (Liotop L101 Lyophilizator, Liobrás, São Paulo, Brazil), diluted with sample buffer and heated to 95°C for 5 minutes. A 15% separating gel with 4% stacking gel was used, and aliquots of 10 µL of cheese solution (4 mg/mL) were injected in each well of a vertical gel electrophoresis unit (Bio Rad Mini Protean Tetra Cell, Richmond, CA, USA). Electrophoresis separations were performed at constant voltage (200 V). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.3% w/v) in 40% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid followed by destaining using 40% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. A commercial milk powder (Molico[®], Nestlé, Brazil) and molecular weight standards (SDS-PAGE Standards/broad range, Bio-Rad

Laboratories, Richmond, CA, USA) containing proteins from 6.5 kDa (aprotinin) to 202 kDa (myosin) were loaded on separate wells. The molecular weights were estimated by comparing the relative mobility of the protein bands to standard proteins. The gels were scanned (Scan jet Hewlett Packard 5590, CA, USA), and then the standards and the proteins bands densities were processed using the ImageJ image analysis software v1.46r (NIH, Bethesda, MD, USA, <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>). Quantitative determination of casein and β -lactoglobulin (β -LG) was made by peak area integration of densitometer traces and the ratio of these areas (caseins/ β -LG) was calculated. These analyses were done in triplicate.

2.6 Statistical analysis

The significance of the differences between the means of the samples was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Linear correlation from regression analysis was performed to verify the relationship between the analyses. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using STATISTICA 7.0 (STATSOFT, Tulsa, OK, USA).

3 Results and discussion

3.1 Physicochemical analysis

A wide variation in the results for moisture, fat, fat in dry matter and protein contents among the different brands of commercial Minas Frescal cheese is shown in Table 1.

Table 1. Physicochemical composition and color parameters (L*, a*, b*) of the commercial minas frescal cheeses.

Samples	Moisture (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Fat in dry matter (g/100 g)	Protein (g/100 g)	L*	a*	b*
1	58.53 ± 0.27 ^j	15.65 ± 0.37 ^l	37.73 ± 0.66 ^{ij}	19.86 ± 0.03 ^{c,d,e}	86.59 ± 0.22 ^{ij}	-2.95 ± 0.19 ^{g,h}	15.93 ± 0.28 ^{g,h}
2	60.25 ± 0.01 ^h	9.19 ± 0.16 ^{m,n}	23.12 ± 0.38 ⁿ	24.95 ± 0.38 ^a	87.94 ± 0.14 ^{e,f}	-2.95 ± 0.03 ^{g,h}	16.80 ± 0.09 ^{e,f}
3	68.12 ± 0.04 ^d	14.11 ± 0.21 ^{j,k}	44.24 ± 0.59 ^{d,e,f}	13.46 ± 0.33 ^{ij}	89.02 ± 0.19 ^{c,d}	-2.28 ± 0.13 ^{b,c,d}	19.78 ± 0.05 ^c
4	71.58 ± 0.03 ^b	10.70 ± 0.39 ^l	37.63 ± 1.33 ^{ij}	13.81 ± 0.04 ^{ij}	90.77 ± 0.17 ^b	-0.89 ± 0.04 ^a	20.38 ± 0.10 ^{b,c}
5	59.48 ± 0.01 ⁱ	15.71 ± 0.05 ^{hi}	38.76 ± 0.11 ^{hi}	20.61 ± 0.07 ^{b,c}	89.52 ± 0.36 ^c	-2.68 ± 0.08 ^{d,e,f,g}	19.66 ± 0.33 ^c
6	74.49 ± 0.02 ^a	8.08 ± 0.33 ⁿ	31.67 ± 1.25 ^{l,m}	12.71 ± 0.35 ^j	92.06 ± 0.07 ^a	-1.99 ± 0.05 ^{b,c}	13.57 ± 0.28 ⁱ
7	63.33 ± 0.15 ^e	15.24 ± 0.48 ^{ij}	41.44 ± 0.99 ^{f,g,h}	15.37 ± 0.12 ^g	92.38 ± 0.17 ^a	-2.59 ± 0.03 ^{d,e,f,g}	15.49 ± 0.15 ^{g,h}
8	68.43 ± 0.01 ^d	12.91 ± 0.39 ^k	40.88 ± 1.22 ^{g,h}	14.07 ± 0.11 ^{hi}	91.01 ± 0.24 ^b	-2.41 ± 0.07 ^{c,d,e,f}	17.31 ± 0.08 ^{d,e}
9	57.78 ± 0.23 ^k	16.95 ± 0.10 ^{g,h}	40.15 ± 0.02 ^{hi}	21.34 ± 0.61 ^b	87.84 ± 0.09 ^{e,f,g}	-3.22 ± 0.08 ^{hi}	18.05 ± 0.15 ^d
10	57.84 ± 0.11 ^k	9.80 ± 0.13 ^{l,m}	23.23 ± 0.25 ⁿ	25.91 ± 0.69 ^a	87.13 ± 0.53 ^{g,hi}	-3.59 ± 0.35 ^{ij}	15.21 ± 0.38 ^h
11	53.05 ± 0.04 ^m	24.64 ± 0.40 ^{a,b}	52.47 ± 0.81 ^a	18.67 ± 0.11 ^e	86.33 ± 0.23 ^j	-3.50 ± 0.41 ^{ij}	17.31 ± 0.05 ^{d,e}
12	52.46 ± 0.01 ^m	21.66 ± 0.33 ^d	45.56 ± 0.68 ^{d,e}	19.69 ± 0.03 ^{c,d,e}	87.43 ± 0.23 ^{f,g,h}	-3.55 ± 0.12 ^{ij}	20.89 ± 0.40 ^b
13	70.26 ± 0.07 ^c	10.38 ± 0.01 ^{l,m}	34.91 ± 0.04 ^{jk}	12.81 ± 0.04 ^{ij}	87.68 ± 0.18 ^{f,g}	-1.92 ± 0.06 ^b	12.51 ± 0.26 ^j
14	51.13 ± 0.28 ⁿ	25.57 ± 0.49 ^a	52.32 ± 0.71 ^{a,b}	19.09 ± 0.12 ^{d,e}	87.79 ± 0.17 ^{e,f,g}	-2.84 ± 0.11 ^{f,g,h}	17.36 ± 0.20 ^{d,e}
15	54.88 ± 0.24 ^l	20.36 ± 0.32 ^e	45.13 ± 0.49 ^{d,e}	19.24 ± 0.23 ^{d,e}	88.43 ± 0.34 ^{d,e}	-2.80 ± 0.16 ^{e,f,g,h}	15.50 ± 0.32 ^{g,h}
16	61.25 ± 0.24 ^g	13.05 ± 0.14 ^k	33.68 ± 0.15 ^{kl}	20.69 ± 0.80 ^{b,c}	88.80 ± 0.18 ^{c,d}	-2.34 ± 0.16 ^{b,c,d,e}	13.35 ± 0.02 ⁱ
17	57.82 ± 0.02 ^k	18.23 ± 0.36 ^f	43.20 ± 0.83 ^{e,f,g}	20.05 ± 0.01 ^{c,d}	88.85 ± 0.29 ^{c,d}	-2.92 ± 0.12 ^{g,h}	16.13 ± 0.19 ^{f,g}
18	62.18 ± 0.05 ^f	17.64 ± 0.40 ^{f,g}	46.64 ± 0.98 ^{c,d}	15.21 ± 0.08 ^{g,h}	89.38 ± 0.17 ^c	-3.18 ± 0.04 ^{hi}	16.74 ± 0.23 ^{e,f}
19	55.05 ± 0.04 ^l	22.27 ± 0.36 ^{c,d}	49.53 ± 0.35 ^{b,c}	16.79 ± 0.36 ^f	87.77 ± 0.07 ^{e,f,g}	-3.78 ± 0.04 ^j	21.97 ± 0.41 ^a
20	50.07 ± 0.16 ^o	23.44 ± 0.36 ^{b,c}	46.93 ± 0.57 ^{c,d}	21.36 ± 0.13 ^b	86.73 ± 0.12 ^{hi,j}	-3.20 ± 0.09 ^{hi}	20.66 ± 0.13 ^b
21	63.03 ± 0.30 ^e	10.92 ± 0.20 ^l	29.53 ± 0.30 ^m	21.81 ± 0.09 ^b	88.98 ± 0.29 ^{c,d}	-2.90 ± 0.06 ^{g,h}	11.59 ± 0.47 ^k

Results expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

^{a-o} Within a column, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the samples.

Cichoski et al. (2002) reported that, besides the processing technologies used, the composition of raw milk is among the major factors that determine the quality of the cheese. Guo et al. (2004) and Martín-González et al. (2007) also confirm that the milk treatment prior to the cheese-making directly affects the composition of cheeses. It was possible to note that most of the cheese samples showed moisture contents higher than 55 g/100g, as established by official regulation in Brazil (BRASIL, 2004). Regarding fat content, Cruz and Gomes (2001) also noted similar variation in commercial Minas Frescal cheese from different brands. However, the fat content determined in the present study for some samples was lower than that verified by Fritzen-Freire et al. (2010b) and Piazzon-Gomes et al. (2010), who obtained values for Minas Frescal cheese equal to 18.1 g/100g and between 15.8 and 16.2 g/100g, respectively. In this study, some samples showed contents of fat in dry matter higher or lower than those established by Brazilian official regulation, i.e., between 25.0 and 44.9 g/100g. These inconsistencies could be correlated ($P < 0.05$) with the moisture content ($R = - 0.457$) and strongly correlated ($P < 0.05$) with the fat content ($R = 0.886$). In relation to protein content, it was noted that their values were similar or higher than those determined by Buriti et al. (2005) (11.22 to 11.86 g/100g), Fritzen-Freire et al. (2010b) (13.44 g/100g) and Piazzon-Gomes et al. (2010) (14.98 g/100g). A correlation ($P < 0.05$) was also noted between the contents of moisture and protein ($R = - 0.649$). Guinee, O’Kennedy and Kelly (2006) noted that the level of cheese moisture decreased significantly upon increasing protein level. Since those authors used one definite manufacturing process and only varied the protein level, it’s difficult to compare these conditions with the wide differences in manufacture and composition of the commercial samples assessed in this work. Due to the low correlation coefficients found in this study, along with the wide variation in physicochemical results, it can be concluded that processing parameters shall be quite different for the evaluated products.

3.2 Color analysis

Color parameters are extremely important in food science, because they are directly responsible for product appeal and consumer acceptability. However, data referring to Minas Frescal commercial samples $L^*a^*b^*$ color assessment is inexistent. In the present work, it was possible to note relevant differences in the L^* , a^*

and b^* parameters among the samples (Table 1). L^* parameter indicates lightness and the capacity of an object to either reflect or transmit light. The present results for lightness were lower than those obtained by Fritzen-Freire et al. (2010a) in Minas Frescal cheeses made with probiotics and direct acidification.

All the samples showed a low a^* value, indicating a tendency to the green color. These results occurred probably because of the presence of riboflavin, as cited by Mestdagh et al. (2011). In relation to the b^* parameter, all the cheese samples showed positive values, indicating a tendency towards yellow. Finally, it was possible to verify in this work that the cheeses showed a yellowish white color, which mostly contributed to the color characteristics of the cheeses, due to the predominance of yellow rather than green. Unfortunately, correlation coefficients between L^* , a^* and b^* and cheeses' chemical composition were very low. Since Brazilian regulation does not make any mention about instrumental color parameters, a lack of standardization in Minas Frescal processing seems to be evident, and additional research focusing on instrumental color assessment shall be encouraged to obtain clear data.

3.3 Rheological properties

The rheological properties of cheese are important as a means of determining its body and texture for quality and identity, as well as a means of studying its structure according to its composition and the processing techniques used (KONSTANCE; HOLSINGER, 1992). In the uniaxial compression tests, a constant rate of compression is applied to the material at large deformations to determine fracture properties (PAPPA; KANDARAKIS; MALLATOU, 2007). In stress relaxation tests, a constant strain is applied and the stress required to maintain the deformation is measured as a function of time (DEL NOBILE et al., 2007). The rheological data of uniaxial compression (fracture stress (σ) and fracture strain (ϵ), as well as the stress relaxation data (degree of solidity ($1 - c_1$) and the stress decay (c_1/c_2), are shown in Table 2. For each parameter evaluated, it was possible to note a large variation between the samples.

Table 2. Results of rheological parameters of uniaxial compression and relaxation of commercial minas Frescal cheeses samples.

Samples	Fracture stress (σ) (kPa)	Fracture strain (ϵ) (-)	Degree of solidity ($1 - c_1$) (-)	Stress decay rate (c_1/c_2) (s^{-1})
1	86.99 ± 2.48 ^{c,d}	0.69 ± 0.00 ^a	0.416 ± 0.017 ^c	0.663 ± 0.033 ^{d,e,f}
2	140.01 ± 2.56 ^a	0.69 ± 0.00 ^a	0.415 ± 0.010 ^c	0.697 ± 0.047 ^{d,e}
3	66.94 ± 4.37 ^{f,g}	0.53 ± 0.01 ^{c,d}	0.503 ± 0.013 ^{a,b}	0.888 ± 0.024 ^{a,b}
4	65.47 ± 2.55 ^{f,g}	0.57 ± 0.05 ^a	0.509 ± 0.007 ^a	0.693 ± 0.037 ^{d,e}
5	89.55 ± 7.59 ^{c,d}	0.67 ± 0.02 ^a	0.493 ± 0.009 ^{a,b}	0.871 ± 0.040 ^{a,b,c}
6	69.82 ± 3,76 ^{f,g}	0.57 ± 0.04 ^{b,c}	0.507 ± 0.016 ^a	0.723 ± 0.055 ^{d,e}
7	96.62 ± 5.50 ^c	0.51 ± 0.05 ^d	0.517 ± 0.008 ^a	0.760 ± 0.026 ^{b,c,d,e}
8	48.06 ± 3.20 ⁱ	0.57 ± 0.04 ^{b,c}	0.495 ± 0.016 ^{a,b}	0.701 ± 0.085 ^{d,e}
9	86.21 ± 2.65 ^{c,d,e}	0.69 ± 0.00 ^a	0.392 ± 0.022 ^{c,d}	0.728 ± 0.040 ^{d,e}
10	135.26 ± 6.91 ^a	0.69 ± 0.00 ^a	0.384 ± 0.008 ^{c,d,e}	0.682 ± 0.053 ^{d,e}
11	119.38 ± 6.25 ^b	0.69 ± 0.00 ^a	0.470 ± 0.014 ^b	0.937 ± 0.017 ^a
12	86.99 ± 5.76 ^{c,d}	0.69 ± 0.00 ^a	0.332 ± 0.010 ^{f,g}	0.878 ± 0.082 ^{a,b,c}
13	82.00 ± 2.57 ^{d,e}	0.54 ± 0.02 ^{b,c,d}	0.507 ± 0.011 ^a	0.715 ± 0.044 ^{d,e}
14	61.04 ± 3.32 ^{g,h}	0.69 ± 0.00 ^a	0.336 ± 0.008 ^f	0.863 ± 0.046 ^{a,b,c}
15	51.77 ± 1.92 ^{h,i}	0.69 ± 0.00 ^a	0.334 ± 0.008 ^f	0.771 ± 0.086 ^{b,c,d}
16	42.94 ± 0.12 ⁱ	0.69 ± 0.00 ^a	0.297 ± 0.006 ^g	0.875 ± 0.022 ^{a,b,c}
17	75.26 ± 1.99 ^{e,f}	0.69 ± 0.00 ^a	0.364 ± 0.014 ^{d,e,f}	0.718 ± 0.047 ^{d,e}
18	67.60 ± 2.18 ^{f,g}	0.59 ± 0.03 ^b	0.494 ± 0.015 ^{a,b}	0.755 ± 0.056 ^{c,d,e}
19	66.93 ± 4.46 ^{f,g}	0.69 ± 0.00 ^a	0.376 ± 0.015 ^{d,e}	0.534 ± 0.032 ^f
20	123.74 ± 6.84 ^b	0.69 ± 0.00 ^a	0.355 ± 0.018 ^{e,f}	0.761 ± 0.053 ^{b,c,d,e}
21	42.52 ± 1.78 ⁱ	0.69 ± 0.00 ^a	0.376 ± 0.015 ^{d,e}	0.640 ± 0.032 ^{e,f}

Results expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

^{a-i} Within a column, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the samples.

Fracture stress (σ) is a point of maximum stress, where the material shows macroscopic failure (WATKINSON et al., 1997) and a high numerical value indicates toughness (JUAN et al., 2007). Based on the data presented in this work, it can be concluded that the higher numerical values indicate a harder and less breakable material, requiring more strength to fracture it. O'Callaghan and Guinee (2004) confirm that this parameter is related with the strength of cheese matrix; while Fox et al. (2000) state that this behavior is directly related with cheeses that have greater hardness.

The fracture strain (ϵ) is the point which describes the deformability of cheese (JUAN et al., 2007). The ϵ values indicated correlations with protein ($R = 0.831$) and moisture ($R = - 0.791$) contents. The cheese samples with lower moisture and higher protein contents showed resistance to fracture and these results are in agreement with those noted in the σ parameter. Creamer and Olson (1982) reported that the fracture strain in cheese is related to the loss of elastic structural elements when the water content available for the solvation of protein is reduced. According to Juan et al. (2007) and O'Callaghan and Guinee (2004), higher numerical values to ϵ indicate greater deformability, since the ϵ parameter measures the deformation that occurs before the cheese ruptures. The higher numerical values obtained in this study, when compared with those obtained by Fritzen-Freire et al. (2010b), indicate less deformable cheeses. The deformability may be related to the chemical structures of cheese components and also by small variations in the processing technology (FERRANDINI et al., 2011). Such variations may occur especially when cheese is produced by different manufacturers, as observed in this work.

Lucey, Johnson, and Horne (2003) reported that cheese is a viscoelastic material because, during (and after) deformation, part of the mechanical energy supplied is stored in the material (elastic part) and part is dissipated (viscous part). According to the model proposed by Peleg (1980), when $t \rightarrow \infty$, $F_{(t)}/F_0 \rightarrow 1 - c_1$. Thus, if the stress of the specimen fully relaxes, then, $c_1 = 1$ and $1 - c_1 = 0$. When $(1 - c_1)$ reaches 1, the material behaves as an elastic solid; and when $(1 - c_1)$ reaches 0, the material behavior is controlled by the viscous component (MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009). Therefore, from the data obtained for the 'degree of solidity', it was possible to verify that all the analysed samples were characterized by a tendency to be more viscous than elastic. Moreover, a moderate

degree of correlation ($P < 0.05$) with the moisture ($R = 0.710$) and protein ($R = - 0.661$) contents could also be verified. According to Fox et al. (2000), the whey present among the casein micelles acts as lubricant, and thus the cheese samples with higher moisture and lower protein contents result in a net with more viscous characteristics.

An accurate estimation of c_2 is important to determine the rate of stress decay (c_1/c_2). The values of c_1/c_2 for the investigated samples were higher ($P < 0.05$) than those obtained by Fritzen-Freire et al. (2010b) in Minas Frescal cheese. In the present study, all samples showed low mechanical resistance and, therefore, had less elasticity.

3.4 Authenticity assessment

Figure 1 shows the electrophoretic profiles of the studied samples. The identification of proteins may be performed by comparing the electrophoretic mobility of the milk proteins and the molecular weight standard used, as well as by comparing electropherograms from previous studies (JOVANOVIĆ et al., 2007; HERNÁNDEZ; HARTE 2009; HOLLAND et al., 2010). In the present study, a good resolution was obtained, with a clear separation of proteins by SDS-PAGE. Although samples were all labelled as being the same product, electropherograms revealed a wide unexpected variability in their proteins profile, with both caseins (CN) and β -lactoglobulin (β -LG) being present in some samples. Thus, as a way to assess which proteins prevail, a CN/ β -LG ratio was established from the densitometric analysis of the respective bands. These calculations allowed to divide samples into two significantly different groups ($P < 0.05$): the first ($n = 12$), wherein the CN/ β -LG ratio is always greater than 17.9, and the second ($n = 9$), wherein this ratio is close to zero (Figure 2). In the first group, bands corresponding to caseins appear intensively stained, as expected in authentic cheeses. On the other hand, it can be seen, in the second group, that β -LG is predominant in their electropherograms, while caseins appear in low concentration. Moreover, bands corresponding to lactoferrin (Lf), bovine serum albumin (BSA) and immunoglobulin G (IgG) appear quite stained in this group, while in the other samples they are practically inexistent. These facts suggest the presence of whey in the composition of these products, contrary to the enzymatic process required for manufacturing of Minas cheese.

The CN/ β -LG ratios showed a strong correlation ($P < 0.05$) with the degree of solidity ($1 - c_1$) ($R = -0.942$), confirming the tendency to being more viscous shown in the cheese samples with higher casein content. A viscous behavior was also noted by Dahbi et al. (2010) for concentrated industrial suspension with high casein content.

Figura 1. SDS-PAGE patterns of proteins from molecular weight standards (MWS), commercial Minas Frescal cheeses (1 up to 21) and milk. Lf: lactoferrin, BSA: Bovine Serum Albumin and IgG: Immunoglobulin G.

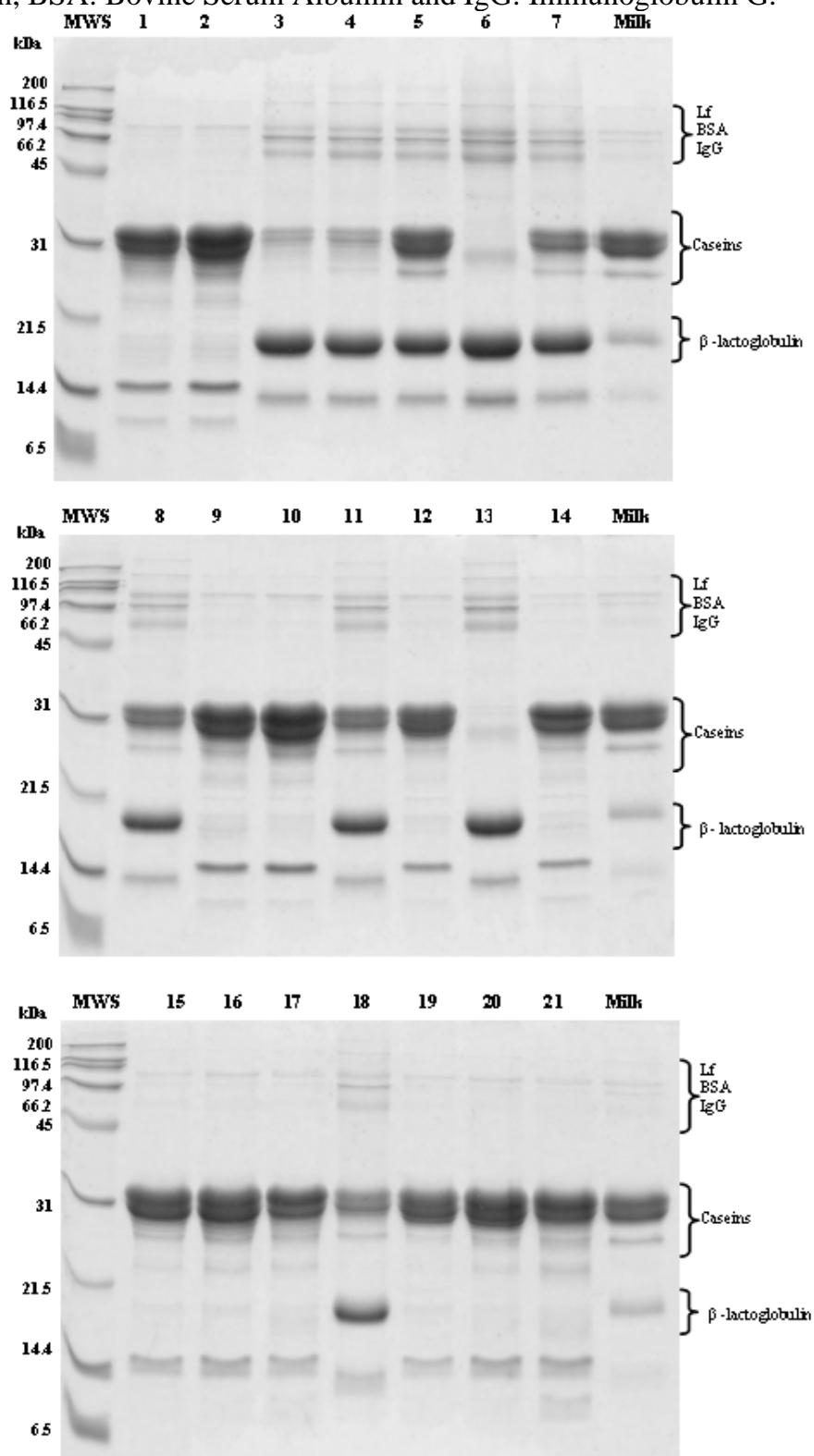
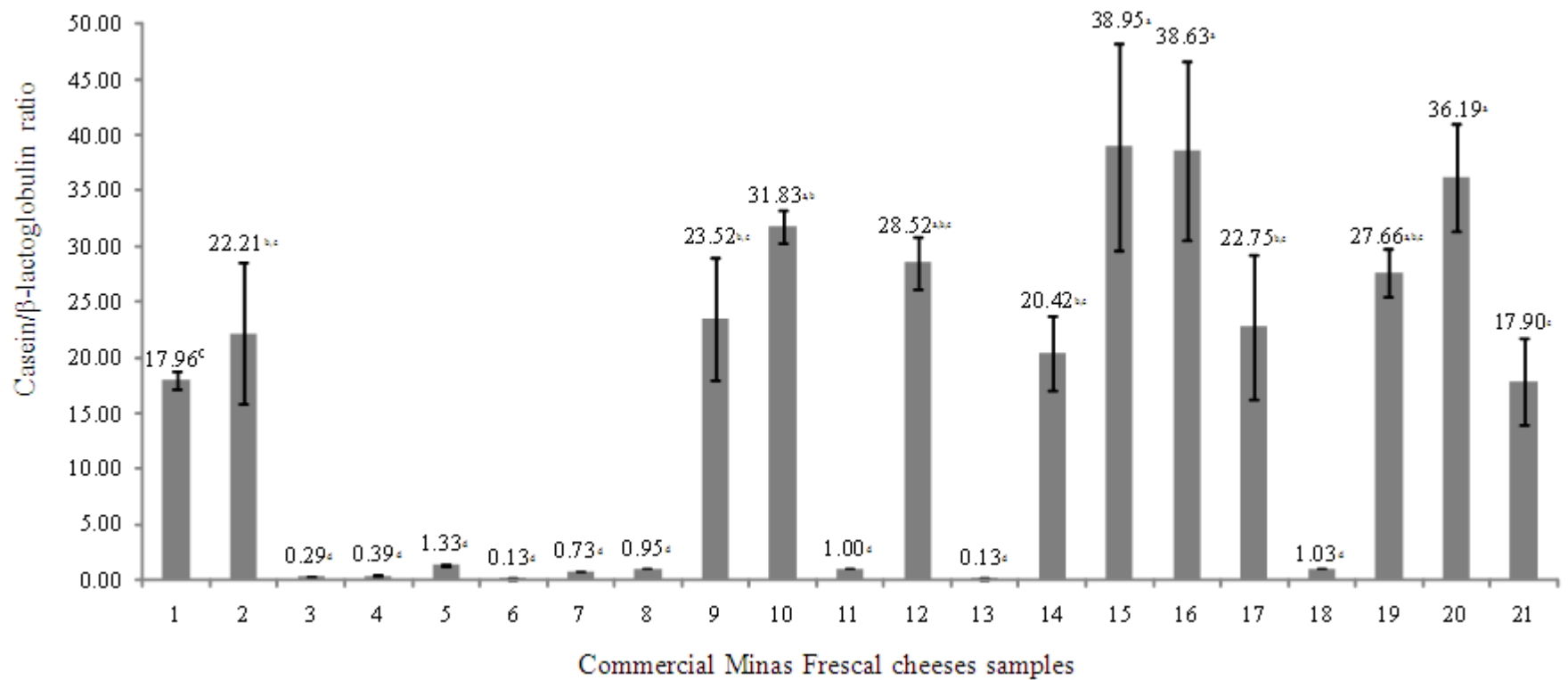


Figura 2. Results of the average \pm standard deviation of the casein/ β -lactoglobulin ratio from densitometry analysis (n = 3). a-d Different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the samples.



A correlation ($P < 0.05$) was also verified between the CN/ β -LG ratio and fracture strain values ($R = 0.767$). Therefore, higher casein content could be responsible for greater cheese deformability. As suggested by Fox et al. (2000), the concentration of casein in the cheese matrix increases, the intra- and inter-strand linkages become more numerous, and the matrix shows a decrease in the viscous component, resulting in an easily deformable structure.

Several reports demonstrate great variation in sanitary and sensorial quality in commercial samples of Minas Frescal cheese (NOGUEIRA; LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006; SOUZA et al., 2008; VISOTTO et al., 2011). According to Brighenti et al. (2008), variations can be expected due to differences in the chemical composition of the raw material or in some manufacturing parameters adopted by the plants. Although these variations have been reported, this is the first study that focuses on authenticity and rheological aspects of commercial samples of Minas Frescal cheese. Furthermore, the correlations between the parameters evaluated in this study indicate that there is a lack of standardization among manufacturers, probably due to the use of unallowed raw material, which may severely compromise the identity of this traditional product.

4 Conclusions

The results from the physicochemical, color, rheological and electrophoretic profile showed that the commercial Minas Frescal cheeses were different, indicating heterogeneity among the different brands available on the market. A greater tendency toward a yellowish white color was noted in the cheese samples. Among the evaluated parameters, the moisture and protein contents affected the rheological properties of the cheeses, which showed a tendency to a matrix with more viscous and firmer characteristics. The SDS-PAGE analysis showed a wide unexpected variation in the type of proteins, with casein bands prevailing in some samples, while β -LG prevailed in others. This wide variation was confirmed in the results of the CN/ β -LG ratio and it was noted that authentic Minas Frescal samples presented higher CN/ β -LG ratios and showed a decrease in the degree of lightness, a viscous behavior, and a greater deformability. These results emphasize the need for a more effective

control, mainly in the selection of raw material, aiming to offer consumers authentic products.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

References

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS –AOAC. Official Methods of Analysis of the association analytical chemists. 18. ed. Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 4, de 1º de março de 2004. Altera o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 352, de 04 de novembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1997.

BRIGHENTI, M. et al. Characterization of the rheological, textural, and sensory properties of samples of commercial US cream cheese with different fat contents. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4501–4517, 2008.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279–1288, 2005.

CALZADA, J. F.; PELEG, M. Mechanical interpretation of compressive stress–strain relationships on solids foods. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 4, p. 1087–1092, 1978.

CHROMIK, C. et al. Adjustment of vat milk treatment to optimize whey protein transfer into semi-hard cheese: a case study. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p.496–503, 2010.

CICHOSCKI, A. J. et al. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physic-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 329–336, 2002.

CREAMER, L. K.; OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 2, p. 634–646, 1982.

CRUZ, C. D.; GOMES, M. I. F. V. Lipid level evaluation in industrialized and handmade minas frescal cheese and ricottas from the region of Botucatu/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 109–112, 2001.

DAHBI, L. et al. Rheology and structural arrest of casein suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 342, n. 2, p. 564–570, 2010.

DEL NOBILE, M.A. et al. Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 978-983, 2007.

FERRANDINI, E. et al. Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of murcia al vino cheese. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 583–588, 2011.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Sensory and mechanical properties of cheese texture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1611–1624, 2007.

FOX, P. F.; COGAN, T. M. **Factors that affect the quality of cheese.** In P. F. FOX; P. L. H. MCSWEENEY; T. M. COGAN; T. P. GUINEE (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3. ed. London: Elsevier Academic Press., 2004.

FOX, P. F. et al. **Cheese rheology and texture.** In P. F. FOX; T. P. GUINEE; T. M. COGAN; P. L. H. MCSWEENEY (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic

Minas Frescal cheese. **International Dairy Journal**, v. 63, n. 561-568, 2010a.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of minas frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 621–627, 2010b.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção** 1. ed. São Paulo, SP: Fonte Comunicações e Editora, 1999.

GUINEE, T. P.; O’KENNEDY, B. T.; KELLY, P. M. Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 468–482, 2006.

GUO, M. et al. Relationship between the yield of cheese (chevre) and chemical composition of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 52, n. 1-2, p. 103–107, 2004.

HERNÁNDEZ, A.; HARTE, F. M. Isolation of caseins from whey proteins by microfiltration modifying the mineral balance in skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5357–5362, 2009.

HOLLAND, B. et al. Separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 893–900, 2010.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo: IAL, 2005.

JOVANOVIĆ, S. et al. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. **Sensors**, v. 7, n. 3, p. 371–383, 2007.

JUAN, B. et al. Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes’ milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 3, p.248–254, 2007.

KONSTANCE, R. P.; HOLSINGER, V. H. Development of rheological test methods for cheese. **Food Technology**, v. 46, n. 1, p. 105–109, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p.2725– 2743, 2003.

MARTÍN-GONZÁLEZ, M. F. et al. Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 697–705, 2007.

MESTDAGH, F. et al. Interaction between whey proteins and lipids during light-induced oxidation. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1190–1197, 2011.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 293-299, 2009.

NOGUEIRA, M. C. L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S. A. A study of the volatile composition of Minas cheese, **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005.

O'CALLAGHAN, D. J.; GUINEE, T. P. **Rheology and texture of cheese**. In P. F. Fox; P. L. H. McSweeney; T. M. Cogan; T. P. Guinee (Eds.). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3. ed., London: Elsevier Academic Press., 2004.

PAPPA, E.C.; KANDARAKIS, I.; MALLATOU, H. Effect of different types of milks and cultures on the rheological characteristic of Teleme cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 143-149, 2007.

- PELEG, M. Linearization of relaxation and creep curves of solid biological materials. **Journal of Rheology**, v. 24, n. 4, p. 451–463, 1980.
- PIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. S. F. Minas frescal cheese with soy product: physical, chemistry and sensorial characteristics. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 77–85, 2010.
- PINHO, O. et al. Chemical, physical, and sensorial characteristics of “terrincho” ewe cheese: changes during ripening and intravarietal comparison. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, p. 249–257, 2004.
- PLANZER JUNIOR, S. B. et al. Food Safety Knowledge of Cheese Consumers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 28-30, 2009.
- ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Conditions of production and distribution of minas fresh cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263–272, 2006.
- SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.
- SOUZA, T. B. et al. Microscopic quality indicators of minas frescal cheese. **Food Control**, v. 19, n. 1, 71–75, 2008.
- VISOTTO, R. et al. Minas Frescal cheese: hygienic-sanitary characteristic and assessment of label information. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.
- WATKINSON, P. et al. Rheological properties and maturation of New Zealand Cheddar cheese. **Lait**, v. 77, p. 109-120, 1997.
- WIUM, H.; QVIST, K. B. Rheological properties of UF-feta cheese determined by uniaxial compression and dynamic testing. **Journal of Texture Studies**, v. 28, n. 4, p. 435–454, 1997.

CAPÍTULO 3

Método de controle para inspecionar a autenticidade da composição de queijo Minas Frescal por eletroforese em gel

Artigo publicado:

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; MOLOGNONI, L.; DAGUER, H. A control method to inspect the compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, n. 33, p. 8333-8339, 2014.

Método de controle para inspecionar a autenticidade da composição de queijo Minas Frescal por eletroforese em gel

Resumo

Este estudo apresenta um método qualitativo desenvolvido para auxiliar na inspeção da autenticidade da composição de queijos brancos frescos como o Minas Frescal, um queijo típico brasileiro, especialmente quando há suspeita de substituição irregular de leite por soro de leite. O método, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida na presença do desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguido pela densitometria da imagem do gel obtido, foi validado. Os queijos foram liofilizados para serem submetidos à eletroforese e a proteína β -lactoglobulina (β -LG) foi escolhida como o marcador de adulteração. A confirmação da identificação do marcador foi realizada através da digestão da banda do gel em tripsina seguido pela análise dos peptídeos obtidos em espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Os queijos que apresentarem no mínimo de 14 mg.g⁻¹ de β -LG são considerados adulterados. O método mostrou precisão satisfatória, com um limite de detecção de 7 mg.g⁻¹. Quarenta e duas amostras comerciais de estabelecimentos inspecionados foram avaliadas e submetidas à análise de *Cluster*. Grupos de amostras conformes e não conformes foram obtidos com 24 (57%) amostras autênticas e 18 (43%) amostras adulteradas, respectivamente, mostrando que o monitoramento analítico adequado é necessário para inibir essa prática.

Palavras chave: SDS-PAGE; Queijo Minas frescal; Adulterações; Inspeção de produtos lácteos; Soro de leite.

A control method to inspect the compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis

Abstract

This study introduces a qualitative method to inspect the compositional authenticity of white non-ripened cheeses like Minas Frescal, a typical Brazilian cheese, especially when irregular replacement of milk by whey is suspected. A sodium-dodecyl sulfate gel electrophoresis (SDS-PAGE) method, followed by image densitometry, was validated. Cheeses were freeze-dried to electrophoresis, and β -lactoglobulin (β -LG) was chosen as the adulteration marker. In-gel trypsin digestion followed by matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry provided its identification. Cheeses with a minimum of 14 mg.g^{-1} of β -LG are considered to be adulterated. The method shows satisfactory precision with a detection limit of 7 mg.g^{-1} . Forty-two commercial samples from inspected establishments were then assessed and subjected to cluster analysis. Compliant and non-compliant groups were settled with 24 (57%) authentic samples and 18 (43%) adulterated samples, respectively, showing that proper analytical monitoring is required to inhibit this practice.

Keywords: SDS-PAGE; white cheeses; adulterations; dairy inspection; whey.

1 Introduction

Minas Frescal is a widely consumed cheese in Brazil. It is a white fresh, ready to consume cheese, that usually presents a whitish internal color, a soft consistence, and a close texture with scarce irregular holes. It is a high moisture cheese, whose flavor ranges from mild to slightly acid (PLANZER JUNIOR et al., 2009; NALDINI; VIOTTO, KUAYE, 2009, SOUZA; SAAD, 2009). A national regulation has been established by inspection authority for this product, which shall be obtained from whole or semi-skimmed pasteurized milk by enzymatic clotting with rennet and/or other appropriate clotting enzymes, complemented or not by the action of specific lactic bacteria (BRASIL, 2004).

In dairy products, modification of composition and adulteration with other dairy or non-dairy ingredients may take place for economic reasons (DE LA FUENTE; JUAREZ, 2005; HRIZIKOVA et al., 2012). In a previous study, unexpected variations were observed in rheological and physicochemical properties of Minas Frescal cheese commercial samples acquired in Brazil. Moreover, based in the electrophoretic profile of those samples, it was suggested that whey was irregularly present in the composition of these products (MAGENIS et al., 2014). Considering the large excess and the low price of whey (RECIO et al., 2000), its fraudulent addition to Minas Frescal cheese production is easily accomplished of financial gains.

Although a reference method is available to detect cow milk in cheeses made from goat, buffalo and ewe milk in European Union (EUROPEAN COMMISSION, 2008), it seems that white cheeses adulteration with whey has not been properly assessed, since no analytical method has been validated or is even available with this purpose. Recently, adulterated goat and ewe cheeses were detected in Croatia by isoelectric focusing (SPOLJARIC et al., 2013). Particularly, the addition of whey to several dairy products has been researched for a long time, and depending on the matrix susceptible to adulteration, a different protein marker has to be selected. Proteomic methods have been described with this purpose, such as the classic detection of caseinomacropeptide (CMP) in milk (MOTTA et al., 2014). In Italy, a proteomic approach was performed to assess the adulteration of mozzarella 'Fiordilatte' with stored curd and a fragment of the main proteolytic product obtained by rennet digestion of α_{S1} -I casein has been patented as a marker protein (FACCIA et al., 2014).

In Brazil, products of animal origin can be inspected by federal, state or municipal governments. Since 2006, in attempt to reduce trading restriction in inspected establishments and also to provide technical and sanitary equivalence among those three inspection levels, the Brazilian System of Inspection (SISBI) was created (BRASIL, 2006). In that system, an authorized establishment, inspected by a state or municipal inspection service officially recognized as equivalent to the federal inspection service, is allowed to trade its products throughout the whole country. In this growing scenario, where the number of medium and small factories is crescent, the importance of having available analytical methods capable of detecting fraudulent trade practices is evident.

Analytical methodologies that allow the characterization of dairy products can be very useful to support regulative authorities as well as food manufacturers (MIRALLES et al., 2000). The polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is a classic separation method which assisted by advanced scanner and image analysis can result in good separations and high resolutions, leading to accurate and reproducible results (PESIC et al., 2011). Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) has been widely used to identify proteins and it fits well to dairy products, separating caseins and whey with good resolution (ALOMIRAH; ALLI, 2004; PATEL et al., 2006; PATEL et al., 2007; JOVANOVIC et al., 2007; OUTINEN; HEINO; UUSI-RAUVA, 2010; PUGLISI, PETRONE; LO PIERO, 2014). This work aimed to validate an electrophoretic qualitative method to detect Minas Frescal cheese's adulteration by replacement of milk by whey, as a control tool to inspect its authenticity.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Whole pasteurized milk (from five different brands), food-grade lactic acid (Purac Sínteses, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil), calcium chloride (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), and commercial rennet (Chr. Hansen A/S, Valinhos, SP, Brazil) were used to prepare cheese reference samples. Commercial Minas Frescal cheeses (n = 42), processed by different state or federally inspected factories (from 7 different states) were purchased at various shops and market stalls in Brazil, within 2-3 weeks after manufacture. Defatted milk powder (Nestlé Brasil Ltda., Araraquara, SP, Brazil) and whole pasteurized milk were purchased at local market. Demineralized whey powder (12.5% net

protein content) was obtained from Cooperativa Central Aurora Alimentos (Pinhalzinho, SC, Brazil). Trypsin from porcine pancreas and β -lactoglobulin (purity $\geq 90\%$) from bovine milk were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All reagents employed to prepare buffers and solutions were electrophoresis grade and obtained from Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA). All solvents and acids were of analytical grade for HPLC and were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Standard solution was prepared by diluting β -lactoglobulin to 1 mg.mL^{-1} with sample buffer before analysis.

2.2 Reference samples

Five cheeses were manufactured with commercial pasteurized milk as reference Minas Frescal samples at the laboratory. For the processing of each cheese, milk (4 L) was heated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, lactic acid (0.25 mL.L^{-1} of a 85% lactic acid solution), calcium chloride (0.4 mL.L^{-1} of a 40% calcium chloride solution) and commercial rennet (0.9 mL.L^{-1}) were added, followed by incubation at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 40 min. Gel was gently cut into cubes, drained, placed in perforated circular containers (approx. 500 g capacity) and kept overnight under refrigeration for draining. Reference samples were then freeze-dried at a lyophilizer (Liobrás Comércio e Serviço de Liofilizadores, São Carlos, SP, Brazil) and kept at -18°C .

2.3 SDS-PAGE analysis

Freeze-dried cheeses were weighed into polypropylene centrifuge tubes and diluted to 4 mg.mL^{-1} in sample buffer [0.1 M Tris-HCl, pH 6.8; 20% (v/v) glycerol, 2% (v/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue]. Tubes were moderately shaken on a “wrist action” shaker for 30 min and then heated in water (95°C) for 5 min. SDS-PAGE was carried out as originally proposed by Laemmli (1970) on a 15% (w/v) separating gel and sample aliquots of 5 μL were loaded per well at a Mini Protean® Tetra Cell cube (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Gels were run at constant voltage (200 V) for 45 min. Molecular weight standards (MWS), consisting of a cocktail of proteins of known molecular weights (aprotinin, 6.5 kDa; lysozyme, 14.4 kDa; trypsin inhibitor, 21.5 kDa; carbonic anhydrase, 31 kDa; ovalbumin, 45 kDa; serum albumin, 66.2 kDa; phosphorylase b, 97.4 kDa; β -galactosidase, 116.25 kDa; myosin, 200 kDa) (Bio-Rad

Laboratories Inc., Hercules, CA) was run together with cheese samples. MWS solution was prepared by diluting the standards 1:20 in sample buffer, followed by heating for 5 min at 95°C. The solution was cooled and an aliquot of 5 µL were loaded at the well. After electrophoresis, gels were stained for 16 h in Coomassie blue dye solution [0.3% (w/v) Coomassie Blue R-250, 10% (v/v) acetic acid and 40% (v/v) methanol], and then destained using 10% (v/v) acetic acid and 40% (v/v) methanol solution until the background color was completely removed. Gels were digitalized using a densitometer (Bio-Rad GS800) and the Quantity One[®] 1-D Analysis software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Densitometry analyses were performed using lane-based background subtraction, followed by measurement of the spots by the area under the peaks. The values in optical density (OD) were then used for statistical analysis. Each sample was analyzed on duplicate gels. Proteins were identified by comparison of their relative mobilities with those of molecular weight standards and by comparison of electropherograms from previous reports (BASCH et al., 1985; ALOMIRAH; ALLI, 2004; PATEL et al., 2006; OUTINEN; HEINO; UUSI-RAUVA, 2010).

2.4 Selection of a marker protein

In order to identify a marker protein to evaluate the authenticity of Minas Frescal cheeses, the SDS-PAGE profiles of reference samples (processed as described above) were assessed. Milk powder and whey powder samples were also used as references. Milk powder and whey powder were weighed (10 mg), diluted in sample buffer (2.5 mL) and subjected to electrophoresis.

2.5 Establishment of an action level

Aiming to establish the level of the marker protein which can be accepted in authentic Minas Frescal cheeses, we assessed 42 commercial samples and five reference samples with SDS-PAGE. Optical densities (OD) values were subjected to clustering using the *K-means* technique ($k = 2$) and the R software (R CORE TEAM, 2013). The two groups formed were classified as compliant or non-compliant. From the compliant group's OD, an action level was then set as follows:

$$\text{Action level} = X + 10.s$$

Equation 1

where X is the β -LG OD mean from compliant samples at cluster analysis and from reference samples and s , standard deviation. Mean was obtained from duplicate determinations.

Aiming to obtain the concentration of the marker protein at the established action level, a reference sample was fortified with β -LG (six levels) and an analytical curve was built from concentrations ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ cheese) versus OD. Fortification was done by preparing a solution of freeze-dried cheese in sample buffer, to which the standard solution was added (at 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). The action level was then calculated in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of cheese by linear regression from the theoretical concentrations of the fortified blank sample versus the respective OD.

2.6 Performance characteristics of method

Confirmation of identity of the marker protein, selectivity/specificity, limit of detection (LoD) and precision were assessed to evaluate method's performance, as recommended by Eurachem (1998) for qualitative methods.

2.6.1 Confirmation of identity of the marker protein and selectivity/specificity

Protein spots corresponding to the selected marker were manually excised from stained gels obtained from whey and the reference sample. Spots were submitted to destaining in 400 μL of a 25 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile solution (1:1, v/v). The solution was replaced by 200 μL of pure acetonitrile for 5 min and dried under vacuum for 15 min. The samples were incubated for 18 h at 37°C in the presence of 10 μL of 0.01 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ trypsin. The peptides were extracted by washing the gel pieces for 3 times with 50% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) solution and then the supernatant containing digested peptides was transferred into clean tubes. The extract was dried under vacuum and solubilized in 0.1% TFA. Then 0.5 μL of sample was thoroughly mixed with 0.5 μL of a saturated matrix solution (10 mg α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% v/v acetonitrile, 1% v/v TFA, 49% water). This peptide matrix solution was spotted onto a target plate. The samples were then subjected to matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) on a Autoflex III Smartbean mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen,

Germany) fitted with a 200 Hz Smartbeam pulsed nitrogen laser emitting at 337 nm and operated in reflectron mode. The extraction voltage was 19 kV. Spectral data were collected in the range of 700-3500 Da using positive ionization. Protein identification was performed by searching in the protein sequence database (Swiss-Prot) using the Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com>). The following parameters were used for database search: taxonomy: mammalian; enzyme: trypsin; variable modifications: oxidized methionine; fragment mass tolerance: 0.5 Da; peptide charge: 1 H⁺; precursor mass tolerance: 100 ppm. The search was initially performed on peptide mass fingerprinting method and then the MS/MS Ion Search was used.

2.6.2 Limit of detection (LoD)

Limit of detection was established as follows:

$$LoD = X + 3.s \quad \text{Equation 2}$$

where X is the β -LG optical densities mean from compliant commercial samples at cluster analysis and from reference samples and s means standard deviation. LoD was then calculated in mg.g⁻¹ of cheese by linear regression from the theoretical concentrations of fortified the blank sample versus the respective OD.

2.6.3 Precision

Different blank samples were used to perform the precision assay. Three blank samples were fortified with the marker protein to each concentration: below (0,5 x), at and above (2 x) the action level; and together with three blank sample without fortification was randomly injected in electrophoresis gels. Analysis was carried out by two analysts on different days. Each analyst conducted the analysis and made the reading the results without knowledge of the samples and then precision was assessed by calculating the false positives/false negatives rates as follows:

$$\% \text{ False positives} = \frac{\text{false positives} \cdot 100}{\text{total known negatives}} \quad \text{Equation 3}$$

$$\% \text{ False negatives} = \frac{\text{false negatives} \cdot 100}{\text{total known positives}} \quad \text{Equation 4}$$

3 Results and discussion

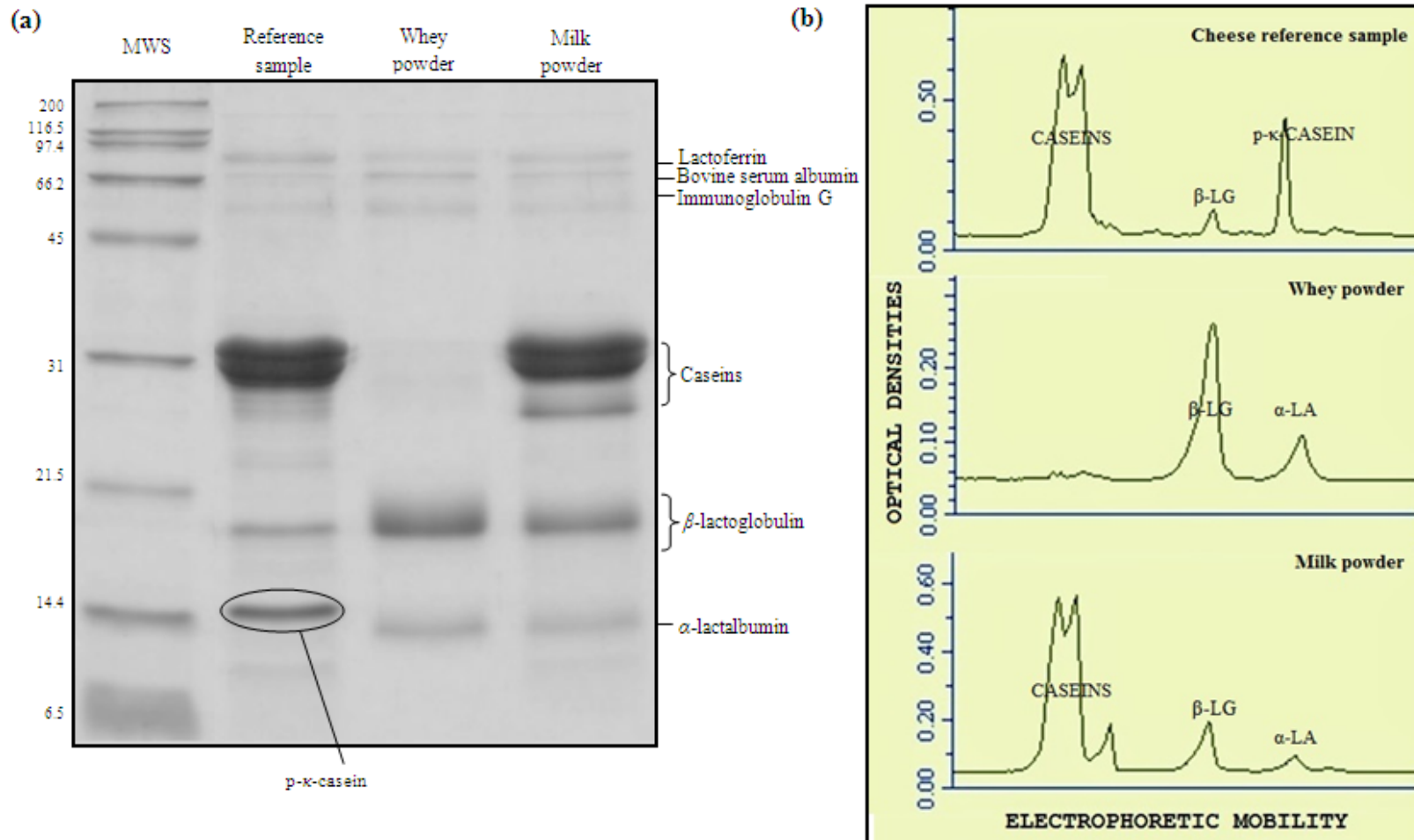
3.1 SDS-PAGE analysis

The major proteins of the milk were individually resolved by SDS-PAGE and then visualized by Coomassie blue staining (Figure 1A). Our results show both typical milk and whey electrophoretic profiles, which major proteins could be identified, as caseins (molecular weight ranging from about 19 kDa to 25 kDa) and whey proteins such as β -LG (molecular weight of about 18.3 kDa) and α -lactalbumin (molecular weight about 14 kDa), in accordance to those cited in the literature (FARRELL JUNIOR et al., 2004; SMOLENSKI et al., 2007). Moreover, some of milk's minor proteins, such as serum albumin, immunoglobulin G (IgG) and lactoferrin were also resolved. As expected, the para- κ -casein peptide was present in all reference samples, and in all authentic Minas Frescal cheese samples.

3.2 Selection of a marker protein

The broad objective in assessing food authentication is to identify markers to characterize the authenticity of food or their potential adulterants/contaminants and use them to resolve authenticity issues. The selected marker has to be specific and its natural variation must be limited and well characterized (PRIMROSE; WOOLFE; ROLLINSON, 2010). Proteins have been widely used as adulteration markers in dairy products, allowing to assess their animal species or even the irregular replacement of milk by whey (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008; MOTTA et al., 2014; FACCIA et al., 2014). In Minas Frescal, β -LG appeared with low optical density (Figure 1B). This behavior is expected, since milk clotting enzyme acts directly on casein, retaining it in the clot, while whey proteins are expelled with aqueous phase (HINRICHS, 2001; DE LA FUENTE; SINGH; HEMAR, 2002). Being the major protein in the composition of whey and in very low concentration in cheese, β -LG was chosen as the marker to assess the compositional authenticity of Minas Frescal with SDS-PAGE.

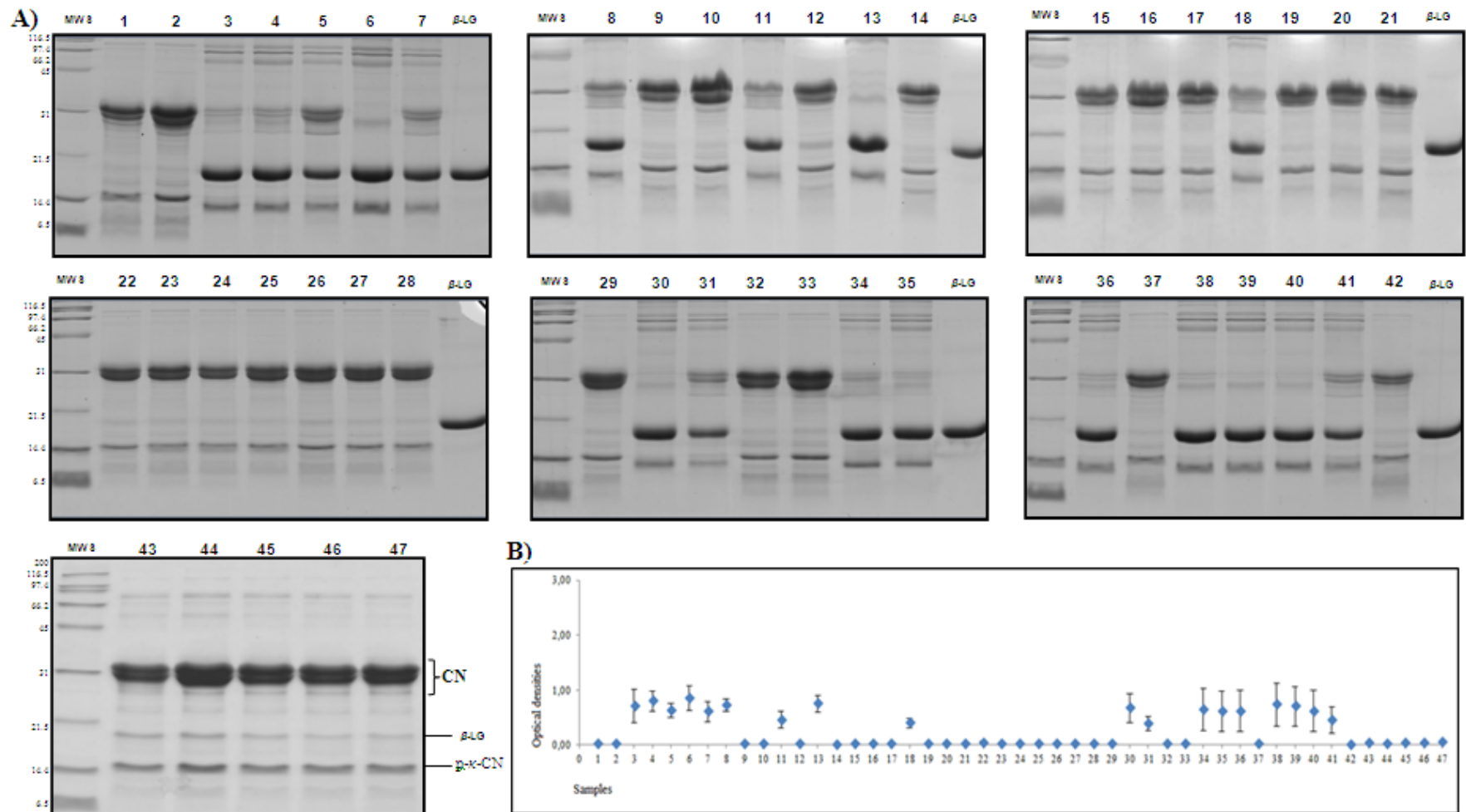
Figure 1. SDS-PAGE electrophoretic proteins profile of a Minas Frescal cheese reference sample, demineralized whey powder and defatted milk powder (A) and respective densitograms (B). α -LA: alfa-lactalbumin; β -LG: beta-lactoglobulin; MWS: molecular weight standards (6.5 to 200 kDa).



3.3 Establishment of an action level

A strong difference among the protein composition of the samples was seen (Figure 2A). In 43% of samples ($n = 18$), caseins appeared as moderately or slightly stained spots. This variable concentration is expected among non-compliant samples, suggesting that, when compositional adulteration occurs, milk is used in different combinations with whey. On the other hand, intense spots of β -LG can be seen. On the contrary, negligible amounts of β -LG can be seen in reference samples (Figure 2B). Since these commercial samples were declared by the producers as manufactured with milk, it can be assumed that in white cheeses like Minas Frescal, a high concentration of β -LG suggests the use of whey as a raw material in its composition, which is inconsistent with the official regulation (BRASIL, 2004).

Figure 2. SDS-PAGE electrophoretic profiles (A) and mean values ($n = 2$) of β -LG optical densities (B) from commercial samples (lanes 1-42) and from reference samples (lanes 43-47) of Minas Frescal cheese. MWS: molecular weight standards (6.5 to 200 kDa); β -LG: β -lactoglobulin; CN: caseins; p- κ -CN: para-kappa-casein.

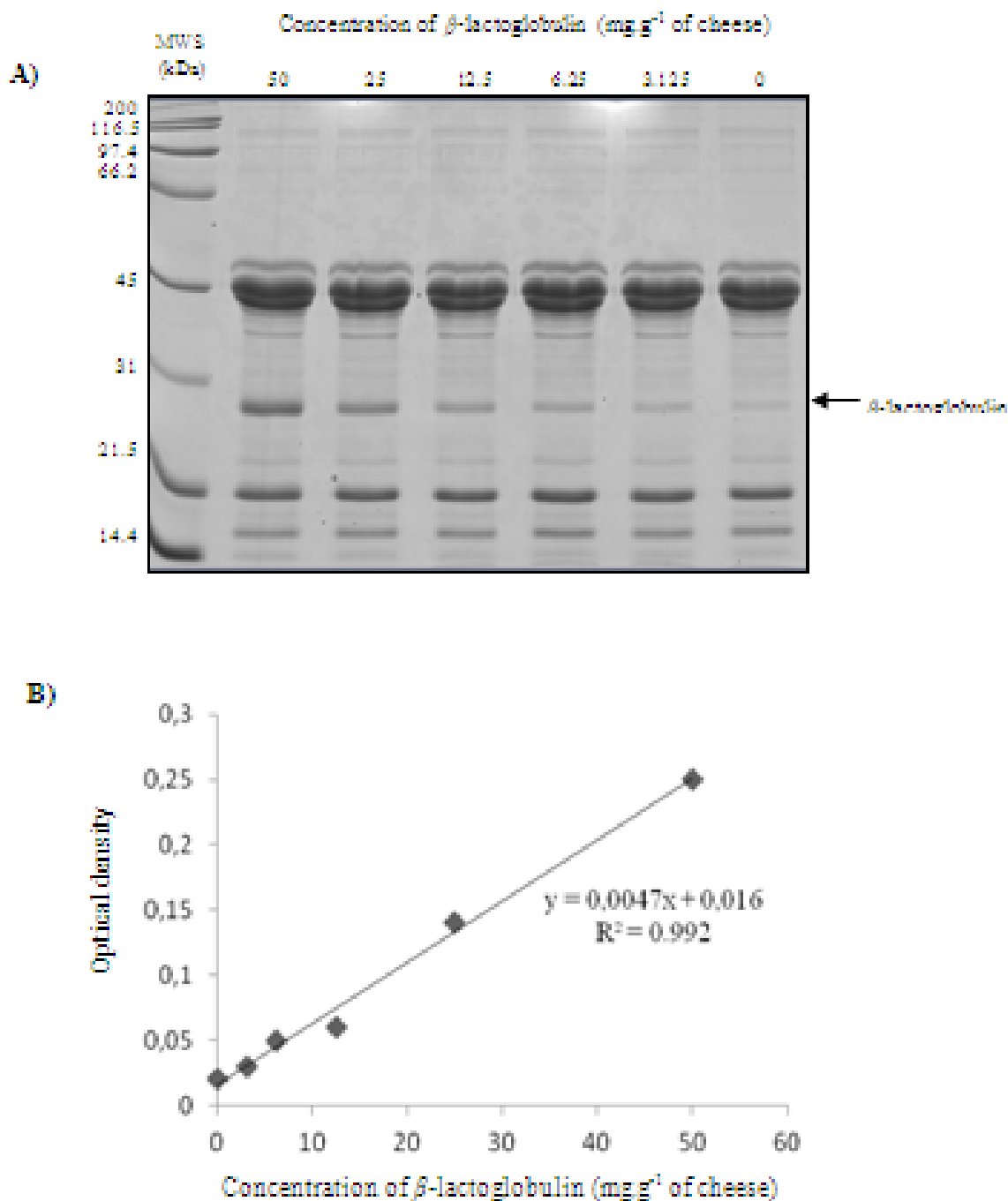


Estimating a “basal value” is important when selecting an authenticity marker, since it can avoid natural errors in milk proteolysis, physiological responses related to feed, climate and several other factors (MOTTA et al., 2014). The presence/absence of an analyte is not considered to be an absolute measure related to a concentration level of zero but to a specific concentration level (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004). Below this limiting level, analyte concentration is considered insignificant and intrinsic of sample’s composition. In this study, the proposal of an action level aimed to settle the maximum OD for the marker protein (β -LG) in a sample of cheese to be considered compliant (i.e., produced from coagulated milk enzyme). Previously, we tried to establish a casein/ β -LG ratio from the densitometry analysis of cheeses, as a way to distinguish compliant from non-compliant Minas Frescal samples (MAGENIS et al., 2014). Although samples could be divided by cluster analysis in two significantly different groups, the wide variation led to settle a single adulteration marker instead of calculating a cut-off value for this ratio.

Optical densities for the β -LG spots from both commercial and reference samples are shown in Figure 2B. Although a wide variation can be observed, cluster analysis revealed two distinct groups: compliant (Group A) and non-compliant (Group B). As expected, Group A consisted of the reference samples and of most commercial cheeses (samples 1, 2, 9, 10, 12, 14-17, 19-29, 32, 33, 37, 42). This cluster showed low OD for the β -LG spot, ranging from 0.01 to 0.04. On the other hand, Group B consisted of the reference samples and most of the commercial samples (samples 3-8, 11, 13, 18, 30, 31, 34-36, 38-41) which showed higher densities for that protein, ranging from 0.39 to 0.85. OD values ranging from 0.04 to 0.39 have not been observed for any sample. Since compliant Minas Frescal cheeses tended to present low OD for β -LG, an action level, based on the mean value (OD = 0.02) presented by this cluster plus the standard deviation multiplied by 10, could be set. Thus, compliant/non-compliant cheeses can be easily distinguished. Linear regression from the theoretical concentrations of fortified blank samples versus the respective OD resulted in the calculation of the concentration of β -LG at the action level (14 mg.g⁻¹). The results shown in Figure 3 indicated that the intensity of the β -LG spot was almost linearly related to the concentration of the analyte ($R^2 = 0.992$). A qualitative method must either respond to the presence or absence of the analyte detected either directly or indirectly in a certain amount of sample (FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002). The

final decision is made by comparing the response of a test sample to the response of a reference sample containing the analyte at the action level. Since the cut-off concentration (action level) has been settled, a blank sample fortified with β -LG must be assessed at the same gel in which unknown samples are being analyzed. If an unknown sample has a higher OD than the fortified sample, it is considered to be positive (non-compliant), and whey must have been used in replacement of milk. On the other hand, if β -LG OD is lower than fortification, sample is considered to be negative (compliant), and milk is presumed to have been properly processed.

Figure 3. Electrophoretic profile (A) and linear regression (B) from a blank sample of Minas Frescal cheese fortified with β -lactoglobulin in different concentrations versus the respective optical density. MWS: molecular weight standards (6.5 to 200 kDa).



3.4 Performance characteristics of method

Table 1 shows the results obtained during performance assessment for this qualitative method.

Table 1. Validation data for the qualitative control method to inspect compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis.

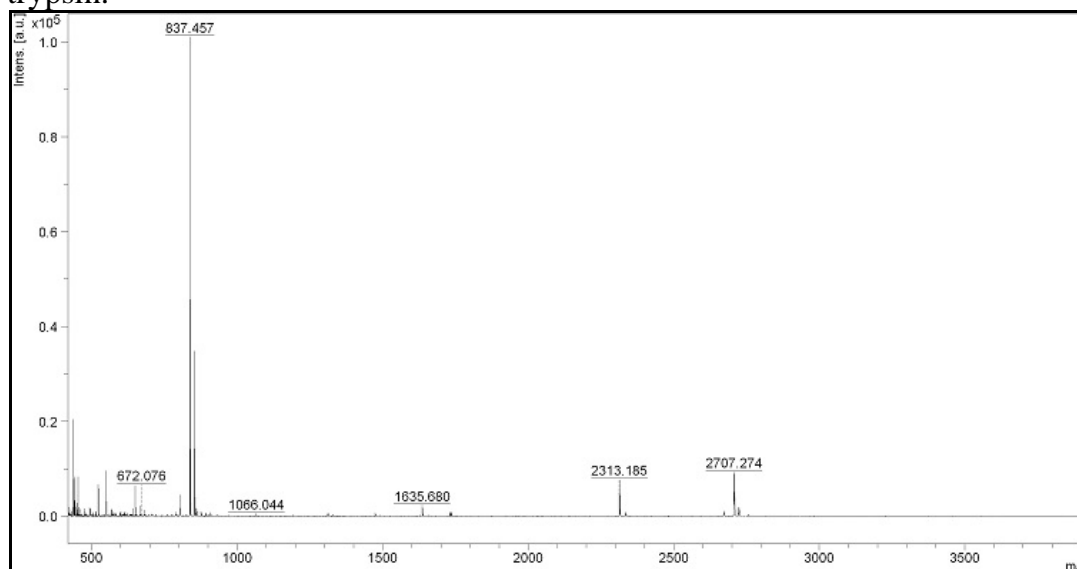
Validation parameter	Methodology	Results
Precision	Analysis of blank (n = 3) and fortified blank different samples (n = 3/concentration) at concentrations below (7.0 mg.g ⁻¹), at (14.0 mg.g ⁻¹) and above (28.0 mg.g ⁻¹) the action level by two analysts.	FP = 0; FN = 0 (A1) ^a FP = 0; FN = 0 (A2) ^a
	Mass spectrometric characterization.	Confirmed identity for <i>Bos taurus</i> β -Lactoglobulin (Mascot score = 146, sequence coverage = 80%, with 17 matching peptides)
Limit of detection (LoD)	LoD = $X + 3.s^b$	$s = 0.006$, LoD = 7 mg.g ⁻¹
Action level	Action level = $X + 10.s^b$	$s = 0.006$, Action level = 14 mg.g ⁻¹

^aFP = false positives; FN = false negatives; A1 = Analyst 1; A2 = Analyst 2.

^b $X = \beta$ -LG optical densities mean from compliant commercial samples at cluster analysis and from reference samples; s = standard deviation.

By the position of the β -LG spots in terms of molecular weight and the peptide mass fingerprints obtained by MALDI-TOF mass spectrometry, identification was provided (Figure 4).

Figure 4. Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrum of *Bos taurus* β -lactoglobulin after in-gel digestion with trypsin.



The use of confirmatory techniques can be useful as a means of verifying the analyte's identity and so to assess the selectivity/specificity of a proposed method (EURACHEM, 1998). By matching the peptide masses generated following the trypsin digestion with those available in the database, the selected spots were successfully identified as homolog to *Bos taurus* β -LG, one of bovine milk's major proteins. Significant ($p < 0.05$) protein scores were obtained (Mascot score = 146). To confirm the identification of β -LG, the MS/MS spectra of three greater intensity peptides (m/z 837; 1635; 2313) were performed. A total of 17 peptides matched with 80% of the β -LG sequence (Table 2). A number of unidentified peaks may represent contaminants from the gel, Coomassie staining, trypsin or the matrix used. Mass spectrometry provides unequivocal molecular mass identification of peptides. The main advantages of MALDI are rapidity, simplicity and sensitivity, especially if compared to electrophoretic and chromatographic techniques (CALVANO et al., 2012). Recently, the combination of two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry was also applied to identify an adulteration marker in mozzarella (FACCIA et al., 2014).

Table 2. Theoretical (expected) and experimental (detected) β -lactoglobulin peptides (m/z) obtained by tryptic digestions in solution.

Sequence	Expected tryptic peptides ^a Mr (calc.)	Detected tryptic peptides Mr (det.)
3 - 24	2274.25	2275.28
25 - 30	672.38	673.43
31 - 56	2706.36	2707.27
57 - 76	2312.25	2313.18
86 - 91	700.44	701.47
87 - 93	801.49	802.96
92 - 99	902.55	903.52
94 - 99	673.41	674.47
94 - 107	1570.87	1571.96
100 - 107	915.46	916.56
108 - 116	1064.57	1066.04
108 - 117	1192.67	1193.59
141 - 151	1244.57	1245.44
141 - 154	1634.76	1635.68
155 - 164	1148.68	1149.73
158 - 164	836.46	837.45
165 - 178	1657.77	1657.67

^aTheoretical digestion performed at Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>).

The LoD was set to 7 mg.g⁻¹, which corresponds to the lowest concentration of the analyte that can be confidently detected by this method. The method presented good precision, since neither false positives nor false negatives have been detected by any analyst below (7 mg.g⁻¹), at (14 mg.g⁻¹) and above (28 mg.g⁻¹) the action level. During the precision assessment, the chosen concentrations for β -LG fortification were considerably lower than the detected concentrations at the adulterated commercial samples, probably because whey is being deliberately used as a non-compliant raw material (Figure 2). Thus, it must be concluded that, when adulteration with whey is practiced during the manufacturing of Minas Frescal cheese, the concentration for β -LG is consistently higher than the action level settled by the present method. Moreover, adulteration with whey may be a common, underestimated feature in the processing of white non-ripened cheeses. This situation may offer economic profit, since whey is cheaper than milk. As previously reported, when adulterated with whey, Minas Frescal cheeses assume some Ricotta-like properties, presenting a yellowish white color, lower moisture content, less deformability and tending to be more

viscous than elastic (MAGENIS et al., 2014). In fact, due to the impossibility of clotting the whey, it can be inferred that heating is employed during the fraud, in a very similar way of Ricotta processing. Adulterated products are then mislabeled, and milk is falsely declared as being used as raw material. Considering the difficulty of identifying this non-compliant practice during factory inspection, laboratory support and availability of a method to detect adulteration of Minas Frescal cheese compositional authenticity is quite convenient.

The proposed method in the present work has been successfully applied in our laboratory and constitutes a simple control tool to inspect Minas Frescal cheese compositional authenticity, being helpful to official dairy inspection. The main advantages of this method rely on the low cost and reasonable simplicity of SDS-PAGE, and the possibility of simultaneous analyzing of several samples. Non-compliant products (43%) were detected, enlightening the need for proper analytical monitoring in order to inhibit this practice.

Acknowledgments

We dedicate and acknowledge Daniel Macedo Lorenzini (*in memoriam*) for this work, whose contribution and technical supervision was invaluable for its realization. MALDI-TOF mass spectrometry was carried out by Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) at Universidade Federal de Santa Catarina. We acknowledge Hernán Terenzi for this facility and Martina Blank for performing peptide identification.

References

ALOMIRAH, H. F.; ALLI, I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 411-419, 2004

BASCH, J. J. et al. Quantitation of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Application of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland-Ashworth Procedure. **Journal Dairy Science**, v. 68, p. 23-31, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006. Regulamenta os artigos 27-A, 28-A e 29-A da Lei nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Altera o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

CALVANO, C. D. et al. Proteomic approach based on MALDI-TOF MS to detect powdered milk in fresh cow's milk. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 61, p. 1609–1617, 2012.

DE LA FUENTE, M. A.; JUAREZ, M. Authenticity assessment of dairy products. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 45, p. 563-585, 2005.

DE LA FUENTE, M. A.; SINGH, H.; HEMAR, Y. Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. **Trends Food Science Technology**, v. 13, p. 262-274, 2002.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Eurachem, 1998. Disponível em: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>. Acesso em 02 de junho de 2013.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No. 273/2008 of 5 march 2005 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) N° 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. **Official Journal of the European Union**, L 81/53, 29.3.2008.

FACCIA, M. et al. Detection of α_{s1} -I casein in mozzarella Fiordilatte: A possible tool to reveal the use of stored curd in cheesemaking. **Food Control**, v. 42, p. 101-108, 2014.

FARRELL JUNIOR., H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W.H. AOAC International Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiology. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1187-1200, 2002.

HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 495–503, 2001.

HRUZIKOVA, J. et al. Discrimination of cheese products for authenticity control by infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, p. 1845-1849, 2012.

JOVANOVIC, S. et al. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. **Sensors**, v. 7, p. 371-383, 2007.

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

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research. Technology**, v. 227, p. 649-665, 2008.

MAGENIS, R. B. et al. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v. 45, p. 22-28, 2014.

- MIRALLES, B. et al. Determination of whey protein to total protein ratio in UHT milk using fourth derivative spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 191-197, 2000.
- MOTTA, T. M. C. et al. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 120, p. 498-505, 2014.
- NALDINI, M. C. M.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct acidification or lactic culture during refrigerated storage. **International Journal Dairy Technoogy**, v. 62, p. 361-365, 2009.
- OUTINEN, M.; HEINO, A.; UUSI-RAUVA, J. Pre-treatment methods of Edam cheese milk. Effect on the whey composition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 647-654, 2010.
- PATEL, H. A. et al. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Le Lait**, v. 87, p. 251-268, 2007.
- PATEL, H. A. et al. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 3409–3420, 2006.
- PESIC, M. et al. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1443-1449, 2011.
- PLANZER JUNIOR., S. B. et al. Food safety knowledge of cheese consumers. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 28-30, 2009.
- PRIMROSE, S.; WOOLFE, M.; ROLLINSON, S. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. **Trends Food Science Technology**, v. 21, p. 582-590, 2010.
- PUGLISI, I.; PETRONE, G.; LO PIERO, A. R. A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella

cheese manufacture. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 67-72, 2014.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.

RECIO, I. et al. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 333-338, 2000.

SMOLENSKI, G. et al. Characterisation of host defense proteins in milk using a proteomic approach. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 207-215, 2007.

SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physicochemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 633-640, 2009.

SPOLJARIC, J. et al. Proving the adulteration of ewe and goat cheese. **Mljekarstvo**, v. 63, p. 115-121, 2013.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 137-145, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados das avaliações físico-químicas, de cor, das propriedades reológicas e do perfil eletroforético das amostras comerciais de queijo Minas Frescal analisadas apresentaram ampla variação, indicando heterogeneidade nas amostras avaliadas durante a realização deste trabalho.

Uma tendência à coloração branco amarelada foi observada entre os queijos e entre os parâmetros reológicos foi verificado queijos com características viscosas e firmes, sendo esses parâmetros afetados pelos teores de umidade e proteína. A análise SDS-PAGE mostrou inesperada variação no tipo de proteínas presentes nos queijos, com predomínio de bandas de caseínas em algumas amostras, enquanto bandas de β -LG predominavam em outras. Essa ampla variação foi confirmada pelos resultados da razão dos valores da densitometria das proteínas CN/ β -LG que foram maiores nas amostras autênticas de queijo Minas Frescal. Esses queijos também mostraram redução dos valores de luminosidade, comportamento viscoso e maior deformabilidade. Verificou-se a presença de soro de leite na composição de amostras de queijo Minas Frescal, contrariando o processo enzimático legalmente exigido para a elaboração desse produto.

O método qualitativo desenvolvido e validado para a inspeção da autenticidade da composição de queijos Minas Frescal suspeitos de serem elaborados com substituição de leite por soro de leite apresentou resultados satisfatórios quanto aos parâmetros de validação e a presença em altas concentrações de β -LG nos queijos Minas Frescal elaborados com soro de leite permitiu utilizar essa proteína como marcador para tal adulteração.

Esse método vem sendo utilizado na avaliação da autenticidade de queijos Minas Frescal no serviço de Fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e auxiliando de maneira mais efetiva no controle da comercialização de produtos adulterados, e dessa forma contribuindo para a aquisição de produtos autênticos pelos consumidores.

ANEXOS

Anexo A - Artigo intitulado “Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese” publicado no periódico *Food Control* (ISSN: 0956-7135).

Acesso do artigo em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514001959>

DOI:10.1016/j.foodcont.2014.04.012




Food Control

Volume 45, November 2014, Pages 22–28



Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese

Renata Bongioiolo Magenis^a, Elane Schwinden Prudêncio^a, Carlise Beddin Fritzen-Freire^b, Marília Penteadó Stephan^c, Antônio Silvio do Egito^d, Heitor Daguer^e  

Anexo B - Artigo intitulado: “A control method to inspect the compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis” **publicado no periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ISSN 0021-8561)**

Acesso do artigo em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf502864e>
DOI: 10.1021/jf502864e

A Control Method To Inspect the Compositional Authenticity of Minas Frescal Cheese by Gel Electrophoresis

Renata B. Magenis,^{†,‡} Elane S. Prudêncio,[‡] Luciano Molognoni,^{‡,§} and Heitor Daguer*[§]


[†]Instituto Federal Catarinense, Campus Rio do Sul, Rio do Sul, Santa Catarina 89160-000, Brazil

[‡]Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88034-000, Brazil

[§]Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, São José, Santa Catarina 88102-600, Brazil




Anexo C - Trabalhos parciais apresentados em eventos





Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology


We certify that the paper entitled
DETECTION OF ADULTERATION OF MINAS FRESCAL CHEESE BY GEL ELECTROPHORESIS
 authored by Renata Bongioi Magenis; HEITOR, D.; PRUDÊNCIO, E.S.; MUÑOZ, I.B.; STEPHAN, M.P.; EGITO, A.S.
 was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and
 Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science
 and Technology"**, held at Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.



 Glaucia Maria Pastore
 Chair


 Della B. Rodriguez-Amaya
 Scientific Committee Chair


Faculdade de Engenharia de Alimentos


UNICAMP


ALACOTA


IUFOST

387d_3b5a_1f06_c323_a1bc_3ee0_a883_eb0a

First International Workshop: Innovation in Food Science

CERTIFICADO

Apresentou o resumo intitulado: DEVELOPMENT OF A QUALITATIVE ELECTROPHORETIC METHOD TO DETECT THE COMPOSITIONAL AUTHENTICITY OF MINAS FRESCAL CHEESE, na forma de PÔSTER, de autoria de Renata Bongioiolo Magenis; Isabella de Bona Muñoz; Elane Schwinden Prudêncio; Luciano Molognoni; Heitor Dagher, no **First International Workshop Innovation in Food Science**, realizado no dia 16 e 17 de Outubro de 2014, no Mercure Convention Hotel, em Florianópolis- SC.



Roseane Fett
Presidente do Evento



Ana Carolina Maisonnave Arisi
Coordenadora do Comitê Científico



Jane Mara Block
Presidente da SBOG

Promoção e realização: Organização:

