



# Determinação da Caseína pelo método ELISA - Implementação e Validação

Catarina Gonçalves Patrício

## **Orientador**

Carlos Reis

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar, realizado sob a orientação científica do Prof. Adjunto Carlos Gaspar Reis, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**Outubro, 2015**



## Agradecimentos

Já alguém dizia: *“Na vida irás encontrar três tipos de pessoas: aquelas que irão mudar a tua vida, aquelas que irão prejudicar a tua vida, aquelas que serão a tua vida.”*

Felizmente encontrei, durante este longo percurso, mais pessoas que zelam pela minha felicidade e sucesso do que pelo insucesso. E a todas elas, aproveitando esta oportunidade, quero expressar a minha gratidão.

Ao Professor Carlos Gaspar Reis, pela disponibilidade prestada, enquanto orientador interno.

Ao Eng.<sup>o</sup> Mauro Conde, que como orientador na empresa SGS, me prestou auxílio aquando preciso.

À professora Fátima Peres, pela disponibilidade e ajuda prestada.

Um obrigado à minha família que foi um pilar forte para que este trabalho fosse concluído com sucesso.

Aos Amigos, que não sendo família do meu sangue, são a família que eu escolhi e a eles tenho muito a agradecer por todo o apoio que incondicionalmente me deram nesta fase da minha vida.

À bonita cidade que é Castelo Branco, pelas experiências aqui vividas, o que decerto me deixará saudade, a saudade de estudante.

A todos aqueles que não me deixaram desanimar, nem que me sentisse sozinha nesta viagem, o meu muito obrigada!

Obrigada a todos!



## Resumo

O presente relatório enquadra-se no âmbito da conclusão da licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar, da Escola Superior Agrária - Castelo Branco (ESACB). Nele é descrito o trabalho desenvolvido durante o período de estágio curricular, no Laboratório de Química, do grupo SGS Portugal S.A., localizado no Pólo Tecnológico de Lisboa.

O trabalho desenvolvido teve como objetivo principal a determinação da caseína através do método ELISA, recorrendo à utilização de um *Kit* comercial de pesquisa da proteína caseína, validando-o em matriz particular, num produto alimentar com leite na sua composição e um produto isento de leite.

Para a validação do método ELISA, serviu de base o *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples*, documento da autoria da empresa acolhedora do estágio, a SGS, Portugal.

## Palavras-chave

Caseína, implementação, validação, método, ELISA.



## **Abstract**

This report aims to be the conclusion of the degree in Biological and Food engineering at Escola Superior Agrária – Castelo Branco (ESACB). It describes the work conducted at the Chemical Laboratory of the SGS group, Portugal S.A, located at the Lisbon technological pole.

The main objective was the validation and implementation of a commercial *kit* for casein protein determination, based on the ELISA method. For this validation, two food products were used, one had milk in its composition and the other was a milk free product.

For the validation of ELISA method the “Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples”, from SGS, Portugal, was used as guide and reference document.

## **Keywords**

Casein, implementation, validation, method, ELISA.



# Índice Geral

Agradecimentos .....	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
1. Introdução.....	1
2. Apresentação da Empresa .....	2
3. Definição de Validação de um Método .....	3
4. Descrição do Método ELISA .....	3
5. Validação do método ELISA na determinação da caseína .....	5
5.1. Curvas de Calibração .....	6
5.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	6
5.3. Precisão: Repetibilidade (r) e Precisão Intermédia ou Reprodutibilidade Interlaboratorial (R <sub>L</sub> ) .....	7
5.4. Exatidão .....	8
5.5. Incertezas.....	9
6. Metodologia.....	9
6.1. Material.....	11
6.2. Preparação dos Reagentes .....	12
6.3. Homogeneização e Moagem .....	14
6.4. Extração .....	14
6.5. Ensaio Imunoenzimático.....	15
7. Resultados e Discussão .....	18
Referências Bibliográficas .....	21
ANEXOS.....	22



## Índice de Figuras

Figura 1 – Procedimento geral do ELISA (Fonte: Gan e Patel, 2013). .....	4
Figura 2 – Kit Bovine Casein ELISA – ELUTION TECHNOLOGIES. ....	10
Figura 3 – Adição das amostras e dos padrões.....	15
Figura 4 – Lavagem dos poços. ....	16
Figura 5 – Adição do anticorpo com enzima conjugada.....	16
Figura 6 – Adição do TMB substrato.....	17
Figura 7 – Adição da Solução STOP.....	17
Figura 8 – Leitura da placa ELISA.....	17
Figura 9 – Primeira Curva de Calibração. ....	23
Figura 10 – Segunda Curva de Calibração. ....	23
Figura 11 – Terceira Curva de Calibração. ....	23
Figura 12 – Quarta Curva de Calibração. ....	23
Figura 13 – Quinta Curva de Calibração.....	23
Figura 14 – Sexta Curva de Calibração.....	23
Figura 15 – Sétima Curva de Calibração.....	23
Figura 16 – Oitava Curva de Calibração. ....	23



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Verificação do Método – Características de Desempenho a Validar. ....	5
Tabela 2 - Critérios da Curva de Calibração.....	6
Tabela 3 – Critérios de Aceitação do Limite de Quantificação. ....	7
Tabela 4 – Critérios de Aceitação da Precisão. ....	8
Tabela 5 – Critérios de Aceitação da Exatidão.....	9
Tabela 6 – Concentração dos padrões.....	10
Tabela 7 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	18
Tabela 8 – Repetibilidade. ....	19
Tabela 9 – Reprodutibilidade.....	19
Tabela 10 – Precisão do <i>kit</i> .....	20



## Lista de Abreviaturas

**CAS** – Caseína

**ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**LD** – Limite de detenção

**LQ** – Limite de quantificação

**ml** – mililitros

**ng** – nanogramas

**ppb** – Partes por bilhão

**ppm** – Partes Por milhão

**R<sub>L</sub>** – Reprodutibilidade

**r** – Repetibilidade

**R<sup>2</sup>** – Coeficiente de determinação

**SD** – Desvio Padrão

**SGS** - Société Générale de Surveillance

**TMB** – tetrametilbenzidina

**μL** - microlitro