

MIRELLA ARAÚJO MAGALHÃES

**DETERMINAÇÃO DE FRAUDE DE LEITE COM SORO DE LEITE  
PELA ANÁLISE DE CMP E PSEUDO-CMP POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE  
REVERSA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE  
MASSA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M188d  
2008

Magalhães, Mirella Araújo, 1981-

Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de cmp e pseudo-cmp por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa / Mirella Araújo Magalhães.

– Viçosa, MG, 2008.

xv, 57f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Mauro Mansur Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 52-57.

1. Leite - Adulteração e inspeção. 2. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 3. Espectrometria de massa.  
4. Leite - Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

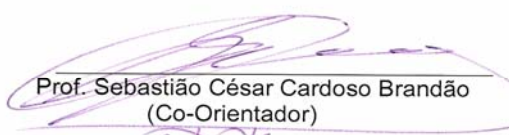
CDD 22.ed. 637.127

MIRELLA ARAÚJO MAGALHÃES

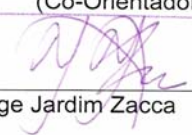
**DETERMINAÇÃO DE FRAUDE DE LEITE COM SORO DE LEITE PELA  
ANÁLISE DE CMP E PSEUDO-CMP POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA COM DETEÇÃO POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSA**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

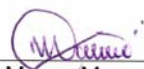
APROVADA: 04 de Novembro de 2008.

  
Prof. Sebastião César Cardoso Brandão  
(Co-Orientador)

  
Prof. Luís Antônio Minim

  
Dr. Jorge Jardim Zacca

  
Profª Edimar Aparecida Filomeno Fontes

  
Prof. Mauro Mansur Furtado  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que sempre está comigo e me dando forças necessárias para conquistar todos os meus objetivos.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso.

A Pró-Reitoria de Administração da Universidade Federal de Viçosa, na pessoa da Fátima Luísa, pelo suporte nas viagens.

A Geralda –DTA, pela ajuda em tudo que precisei.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pela oportunidade de realização do experimento nas dependências do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), e pelo apoio financeiro.

Ao professor Sebastião César Cardoso Brandão, pela orientação nos meus trabalhos, pela amizade, paciência, perseverança e pelo estímulo.

Ao professor Mauro, pela orientação e contribuições.

Ao Policial Federal Jorge Jardim Zacca, pela participação em minha banca e pelas contribuições dadas.

Ao Professor Luis Minim pela ajuda e contribuições na tese

A Professora Edimar, pela colaboração de forma imensurável nas análises estatísticas deste trabalho e pelas contribuições na tese.

A minha mãe Ana Rita Araújo Ferreira Magalhães, verdadeiro amor da minha vida, pelas orações diárias, pelos conselhos, amizade, pelo apoio em meus estudos e na minha vida. Muito obrigada por ser meu “Porto Seguro”.

Ao meu Pai Absalão Ferreira Magalhães, que sempre me deu todo apoio nos estudos, pelas orações e carinho.

A minha irmã Melissa, meu cunhado Vanderley pelo carinho e por estar presente na vida de meus pais quando eu estava distante de casa estudando.

A minha sobrinha Melina, pelas orações verdadeiras e pelas palavras de carinho.

As minhas amigas, Helisa, Fernanda, Flávia Andrade e Ângela, pelo carinho e amizade eterna.

Aos amigos de Pedro Leopoldo, Saulo Mussa, Jordana Hissa, Katinha, , Camila, Dona Geralda, por ter me recebido tão bem em Pedro Leopoldo, pelo apoio, amizade, carinho e por amenizar minha saudade de casa com palavras de afeto. Sem vocês tudo seria mais difícil.

A família de Pedro Leopoldo, Fernando Braga, Martha Braga, Antônio Braga, Eliane Braga e Rodrigo Braga. Agradeço pelo carinho, amizade, aconchego familiar e tantos outros momentos que foram fundamentais para amenizar a saudade de casa, e me dar força para continuar meu trabalho.

Ao amigo Ivan Salvador, pelo carinho incondicional, pela atenção, preocupação e por nunca ter medido esforços para me ajudar, desde o início desta caminhada.

Aos amigos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Geruza, Maria Patrícia, Mateus, Alexandre e Adenilson, pela amizade e conhecimento compartilhado.

A Maninha, Breno, Pâmela, Alcione, por sempre me acolher bem em Viçosa

A Maria Patrícia, amiga que esteve presente em todos os momentos durante a realização deste trabalho, ajudando no experimento, dividindo apartamento, momentos de alegria, tristeza e conhecimento.

A Flávia Malaquias, pelo carinho, amizade e cuidado que sempre teve comigo. Por passar noites em claro, quando eu não conseguia dormir preocupada com o experimento. Minha mãe de Pedro Leopoldo.

AOS AMIGOS DO LANAGRO:

A Eugênia e ao Ricardo pelas oportunidades e apoio financeiro.

A Maria Helena pelo uso dos equipamentos.

Ao Leonardo Souza, pela amizade e ajuda incondicional durante todo o experimento. Sua ajuda foi fundamental para que este trabalho se concretizasse.

Ao amigo Ronaldo Sanches pela amizade e conselhos.

Ao Sergio Dracz, pelos ensinamentos, paciência e orientação.

Ao Rodrigo Ramos, Josefa, Junior, Gilsara, Caio, Lucimere, Moisa, Bruna, Cristiane, Rute, pelo apoio e amizade.

Ao Eduardo por disponibilizar o laboratório do POA para realização do experimento.

Enfim, todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

MIRELLA ARAÚJO MAGALHAÃES, filha de Absalão ferreira Magalhães e Ana Rita Araújo Ferreira Magalhães, nasceu em Coronel Fabriciano, Minas Gerais, em 19 de fevereiro de 1981.

Em julho de 2004, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS-----	viii
LISTA DE QUADROS-----	xi
RESUMO-----	xii
ABSTRACT-----	xiv
1- INTRODUÇÃO-----	1
2-OBJETIVOS-----	3
3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	3
3.1 – Leite UAT.-----	3
3.2- Importância das bactérias psicrotróficas na proteólise do leite-----	4
3.3- Métodos de monitoramento da proteólise do leite-----	7
3.4 - Caseinomacropéptido.-----	10
3.5 - Efeito da Concentração de Ácido Tricloroacético (TCA) na Solubilização do CMP -----	13
3.6 - Métodos para a detecção de fraude de leite com soro de leite-----	14
4 - MATERIAIS E MÉTODOS -----	17
4.1 - Coleta do leite UAT sem CMP-----	17
4.2 - Análises físico-químicas e microbiológicas do leite-----	18
4.3 - Análises das amostras de leite UAT por CLAE-FG-----	18
4.4 - Obtenção do soro de leite-----	19
4.5 - Adição de soro de leite ao leite UAT isento de CMP -----	19
4.6 - Cultivo do leite UAT sem CMP com <i>Pseudomonas fluorescens</i> -----	20

4.7 - Leite UAT sem CMP adicionado de soro de leite após cultivo com <i>Pseudomonas fluorescens</i> -----	21
4.8 - Preparo das amostras de leite UAT para análises de CMP por CLAE-FG e CLAE-FR/EM -----	21
4.9 - Detecção de CMP por CLAE-FR/EM -----	22
4.9.1 - Descrição do equipamento -----	22
4.9.2 - Análises das amostras de leite UAT preparadas para CLAE-FR/EM-----	23
4.9.3 - Determinação do Tempo de Retenção e curva de calibração do CMP-----	23
4.9.3.1 - Em CLAE-FR/EM -----	23
4.9.3.2 - Em CLAE-FG -----	24
4.10 - Análise do leite cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> e adicionado de diferentes concentrações de soro de leite por CLAE-FR/EM-----	24
4.11 - Análises estatísticas-----	25
4.11.1 – Efeito da adição de soro e tempo de incubação de uma cultura de <i>Pseudomonas fluorescens</i> nos métodos de detecção de CMP -----	25
4.11.2 – Efeito da adição de soro e tempo de incubação de uma cultura de <i>Pseudomonas fluorescens</i> na detecção de CMP proveniente do soro de leite e pseudo CMP proveniente de proteases de <i>Pseudomonas fluorescens</i> por CLAE-FR/EM -----	26
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	27
5.1 - Análises físico-químicas e microbiológicas do leite UAT isento de CMP-----	27
5.2 -Análises microbiológicas do leite UAT cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> -	28
5.3 - Detecção do CMP por CLAE-FG -----	28
5.4 - Análise do padrão de CMP em água por CLAE-FR/EM.-----	29
5.5 - Análise do padrão de CMP em leite por CLAE-FR/EM-----	32

5.6 - Aplicação de CLAE-FG para a detecção da presença de soro de leite adicionado ao leite UAT-----	34
5.7 - Aplicação de CLAE-FR/EM para a detecção da presença de soro de leite adicionado ao leite UAT-----	35
5.8 - Análise do leite UAT sem CMP adicionado de diferentes concentrações de soro de leite por CLAE-FG e CLAE-FR/EM-----	37
5.9 - Análise do leite UAT sem CMP cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> , adicionado de soro de leite por CLAE-FG -----	38
5.10- Análise do leite UAT sem CMP, cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> adicionado de soro de leite por CLAE-FR/EM-----	42
5.11- Variação da concentração dos íons de relação massa/carga $1697,4^{+4}$ , $1301,2^{+5}$ e $1358,2^{+5}$ nas amostras de leite UAT sem CMP, cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> adicionado de soro de leite, determinado por CLAE-FR/EM-----	46
6- CONCLUSÃO-----	50
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	51

## LISTA DE FIGURAS

1 - Local da ação da quimosina na $\kappa$ -caseína -----	11
2 - Estrutura primária do glicomacropéptido-----	11
3 - Esquema do experimento de detecção de fraude de leite com soro de leite por CLAE-FR-EM e por CLAE-FG-----	20
4 - Esquema do experimento de detecção de fraude de leite com adição de diferentes concentrações de soro de leite por CLAE-FR/EM e por CLAE-FG, após incubação com <i>Pseudomonas fluorescens</i> .-----	22
5 - Cromatograma (CLAE-FG) do leite UAT adicionado de 90 mg/L do padrão de CMP-----	29
6 - Curva analítica do padrão de CMP (0, 30, 45, 60, 75 e 90 mg/L) em leite analisado por CLAE-FG-----	29
7 - Cromatograma dos íons monitorados obtido na análise do padrão de CMP em água (45 mg/L) por CLAE-FR/EM-----	30
8 - Curva analítica do CMP em água obtido pelo monitoramento do íon específico $1697,4^{+4}$ m/z-----	31
9 - Cromatogramas do padrão de CMP em água nas concentrações de 0, 30, 75 e 90 mg/L, monitorados no íon de relação massa/carga de $1697,4^{+4}$ , analisadas por CLAE-FR/EM -----	31
10 - Cromatogramas do padrão de CMP em leite nas concentrações de 0, 30, 75 e 90 mg/L, monitorados no íon de relação massa/carga de $1697,4^{+4}$ , analisadas por CLAE-FR/EM -----	32

11 - Curva analítica do CMP em leite UAT sem CMP obtido pelo monitoramento do íon específico 1697,4 <sup>+4</sup> m/z-----	33
12 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- espectrometria de massa de ionização por electrospray do CMP (variante A) obtido pelo acompanhamento dos íons específico 1698,4 <sup>+4</sup> , 2264,3 <sup>+3</sup> a partir de aglico-CMPA-----	33
13 - Varredura de massa/carga do pico correspondente ao tempo de retenção de 26,8 minutos obtidos por análise de amostras de manteiga por CLAE/EM-----	34
14 - Cromatogramas (CLAE-FG) do leite UAT adicionado de 15 % (v/v) (A) e 20 % (v/v) (B) de soro de leite-----	35
15 - Cromatogramas da análise de leite UAT sem CMP adicionado de 15% (v/v) de soro de leite, monitorados no íon de relação massa/carga de 1697,4 <sup>+4</sup> e 2263,3 <sup>+3</sup> m/z analisadas por CLAE-FR/EM-----	36
16 - Cromatogramas do padrão de CMP em leite UAT sem CMP adicionada de soro de leite nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% (v/v), monitorado no íon com relação massa/carga de 1697,4 <sup>+4</sup> , analisadas por CLAE-FR/EM-----	37
17 - Variação da área de detecção de CMP em função de diferentes concentrações de soro de leite utilizando como método de análise CLAE-FG e CLAE-FR/EM-----	38
18 - Variação da área de detecção de CMP em função do tempo de incubação de uma cultura psicrotrófica na presença de diferentes concentrações de soro de leite utilizando como método de análise CLAE-FG.-----	39
19- Cromatogramas, por CLAE-FG, do leite UAT cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> e incubado a 7 °C por 4 dias (A) e 6 dias (B) e 8 dias (C)-----	41

- 20- Resultados das análises do CMP verdadeiro (íon  $1697,4^{+4}$  m/z) por CLAE-FR/EM em leite UAT sem CMP, inoculado com *P. fluorescens*, incubado por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, e adicionado de diferentes concentrações de soro (0, 5, 10, 15 e 20% (v/v))-----43
- 21- Cromatogramas obtidos por monitoramento dos íons específicos  $1697,4^{+4}$ ,  $2263,3^{+3}$ ,  $1358^{+5}$ ,  $1301,2^{+5}$ , característico do leite cultivado com *Pseudomonas fluorescens* e incubado por 4 dias (A), 6 dias (B) e 8 dias (C)-----44
- 22- Variação da área dos íons ( $1697,4^{+4}$  m/z)(A),  $1301,2^{+5}$  (B) e  $1358,2^{+5}$  (C) em função do tempo de incubação de amostras de leite UAT sem CMP, inoculado com *P. Fluorescens*, população inicial de  $10^3$  UFC/ml, e posteriormente adicionado de diferentes concentrações de soro de leite analisada por CLAE-FR/EM-----48

## LISTA DE QUADROS

1 - Composição teórica de aminoácidos presentes no glicomacropéptido -----	12
2 - Resultados das análises físico-química e microbiológica do leite UHT sem CMP--	27
3-Efeito do tempo de estocagem do leite UAT, inoculado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre o crescimento de microorganismos psicotróficos-----	28
4 - Resumo da análise de variância de dois métodos utilizados na detecção de CMP em amostras de leite adulterados com diferentes concentrações de soro de leite-----	38
5 - Resumo da análise de variância na detecção de CMP por CLAE-FG em amostras de leite adulterados com diferentes concentrações de soro de leite cultivados com <i>Pseudomonas fluorescens</i> com diferentes tempo de incubação-----	39
6 - Valores médios das áreas de pico do CMP e sua concentração (mg/L), obtido pela análise das amostras de leite cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> em função do tempo de incubação por CLAE-FG-----	42
7 - Valor da concentração (mg/L) do CMP, obtido pela análise do leite sem cultivo e cultivado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> , em diferentes tempo de incubação e concentrações de soro de leite por CLAE-FR/EM.-----	45
8- Resumo da análise de variância na detecção de CMP (1697,4 <sup>+4</sup> ) e dos íons de relação massa 1301,2 <sup>+5</sup> e 1358,2 <sup>+5</sup> m/z em amostras de leite adicionadas de diferentes concentrações de soro após o período de incubação com <i>Pseudomonas fluorescens</i> por CLAE-FR/EM-----	49

## RESUMO

MAGALHÃES, Mirella Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2008. **Determinação de Fraude de Leite com Soro de Leite pela Análise de CMP e Pseudo-CMP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa com Detecção por Espectrometria de Massa.** Orientador: Mauro Mansur Furtado. Co-orientadores: Sebastião César Cardoso Brandão e Nélio José de Andrade

O objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise laboratorial por cromatografia líquida de alta eficiência com Fase Reversa e detecção por Espectrometria de Massa para determinar a adulteração de leite com soro de leite através da detecção de caseinomacropéptido (CMP), e determinar o efeito do cultivo do leite com *Pseudomonas fluorescens* para verificar a ocorrência de CMP ou pseudo-CMP produzido por enzimas termorresistentes de bactérias psicrotóficas.

As amostras de leite foram adicionadas de soro de leite nas concentrações de 0; 5; 10; 15 e 20% (v/v) e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Filtração Gélida (CLAE-FG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa com detecção por Espectrometria de Massa (CLAE-FR/EM). Foi observado que houve diferença entre os métodos de análise ( $p < 0,05$ ) e houve efeito da concentração de soro de leite pelos dois métodos ( $p < 0,05$ ), ou seja, o aumento da concentração de soro acarreta um aumento da área correspondente ao CMP pelos dois métodos. O CMP foi detectado por CLAE-FG no tempo de retenção em torno de 5,7 minutos. Quando analisado por CLAE-FR/EM, o CMP foi detectado no tempo de retenção em torno de 19 minutos e caracterizado pelos íons de relação massa/ carga  $1697,4^{+4}$  e  $2263,3^{+3}$ .

As amostras de leite cultivadas com *Pseudomonas fluorescens* foram incubadas por diferentes dias (0, 2, 4, 6 e 8) a 7 °C, adicionadas de diferentes concentrações de soro de leite (0; 5; 10; 15 e 20% (v/v)) e analisadas por CLAE-FG e CLAE-FR/EM. Nas amostras de leite adicionadas de *Pseudomonas fluorescens* e sem adição de soro de leite, analisadas por CLAE-FG, quando incubadas por até 2 dias, não foi verificada presença de CMP. Porém as amostras de leite incubadas por tempo acima de 2 dias foi verificada a presença de CMP, não proveniente da adulteração do leite com soro de leite. As mesmas amostras de leite adicionadas de *Pseudomonas fluorescens* e sem adição de soro, analisadas por CLAE-FR/EM, e incubadas por até 2 dias não apresentou

aumento da área de detecção do CMP. Porém nas amostras de leite incubadas por tempo acima de 2 dias foi verificada a presença de CMP, caracterizado pelos íons de relação massa carga 1697,4<sup>+4</sup> e 2263,3<sup>+3</sup> e outros íons 1358<sup>+5</sup>, e o 1301,2<sup>+5</sup>. Estes últimos íons são oriundos da hidrólise da  $\kappa$ -caseína pelas enzimas termorresistentes de *Pseudomonas fluorescens*

O método de análise por CLAE-FG não diferenciou o CMP proveniente do soro de leite, do CMP e/ou do pseudo-CMP produzido por proteases de *P. fluorescens*. A análise de CMP no leite por CLAE-FR/EM foi eficaz para detectar a adição de soro de leite ao leite sem proteólise. Além disso, quando o leite foi proteolizado por enzimas de *P. fluorescens* este método conseguiu indicar que houve proteólise. Porém, quando o leite estiver proteolizado por *P. fluorescens*, e estiver sido adicionado de soro, não tem como quantificar o CMP que foi produzido somente pela *P. fluorescens* e o que foi devido somente à adição de soro. Sendo assim, o resultado do Índice de CMP, como previsto na IN 69/2006, é um excelente indicador da intensidade de proteólise das proteínas do leite, ou então da adição fraudulenta do leite com soro de leite, quando analisado por CLAE-FR/EM, sendo um indicador eficiente da qualidade do leite.

## ABSTRACT

MAGALHÃES, Mirella Araújo, M.Sc., Federal University of Viçosa, November, 2008. **Determining Milk Fraud with Whey by Analyses of CMP and Pseudo-CMP by High Performance Liquid Chromatography in reversed phase with detection by mass spectrometry.** Adviser: Mauro Mansur Furtado. Co-advisers: Sebastião César Cardoso Brandão and Nélio José de Andrade

The main objective of this work was the development of a method of analysis by High Performance Liquid Chromatography with reversed phase and detection by mass spectrometry to determine the adulteration of milk with whey by detection caseinomacropeptídeo (CMP), and determine the effect on the cultivation of milk with *Pseudomonas fluorescens* to verify the occurrence of pseudo-CMP or CMP produced by thermo-resistant enzymes of psychrotrophic bacteria.

The milk samples were added of whey at concentrations of 0, 5, 10, 15 and 20% (v / v) and analyzed by High Performance Liquid Chromatography - Géllica Filtration (GF-HPLC) and High Performance Liquid Chromatography Reverse-phase with detection by Mass Spectrometry (HPLC-RP/MS). It was observed that there was a difference between the methods of analyses ( $p < 0.05$ ) and there was an effect of the whey concentration by two methods ( $p < 0.05$ ), that is, the increasing on the whey concentration also causes an increasing on the corresponding area of CMP by the two methods. The CMP was detected by HPLC-GF with retention time of around 5.7 minutes. When it was analyzed by HPLC-RP/MS, the CMP was detected at retention time around 19 minutes and characterized by ions of mass/charge 1697.4<sup>+4</sup> and 2263.3<sup>+3</sup>.

The samples of milk cultivated with *Pseudomonas fluorescens* were incubated on different days (0, 2, 4, 6 and 8) at 7 °C, added in different concentrations of whey (0, 5, 10, 15 and 20% (v / v)) and analyzed by HPLC-FG and HPLC-RP/MS. On samples of milk added with *Pseudomonas fluorescens* and no addition of whey, analyzed by HPLC-FG, when incubated for up to 2 days, CMP was not found. Though, on samples of milk incubated for over 2 days, CMP was found; not deriving from the adulteration of milk with whey. The same samples of milk added to *Pseudomonas fluorescens* and no whey, analyzed by HPLC-RP/MS and incubated for up to 2 days did not present any increasing on the detection area of CMP. Though, on samples of milk incubated for over

2 days, CMP was found, characterized by ions of relation mass/charge 1697,4<sup>+4</sup> and 2263,3<sup>+3</sup> and other ions 1358<sup>+5</sup>, and the 1301,2<sup>+5</sup>. These latter ions derive from the hydrolysis of  $\kappa$ -casein by thermo-resistant enzymes of *Pseudomonas fluorescens*.

The method of analyses by LAE-FG did not differentiate the CMP deriving from whey, from CMP and/or pseudo-CMP produced by proteolysis of *P. fluorescens*. The analyses of CMP in the milk by CLAE-FR/EM were efficient to detect the adding of whey to the milk without proteolysis. Besides that, when the milk was proteolized by enzymes of *P. fluorescens* this method could indicate that there was proteolysis. Though, when the milk is proteolized by *P. fluorescens*, and when whey was added, there was no way of quantifying the CMP that was produced only by *P. fluorescens* and which was only due to the adding of whey. In such case, the result of the Index of CMP, as foreseen on IN 69/2006, is a great indicator of the intensity of proteolysis of milk protein, or then, from the fraudulent adding of milk and whey, when analyzed by CLAE-FR/EM, being then a great indicator of the quality of the milk.

## 1- INTRODUÇÃO

A adulteração de leites, fluido e em pó, através da adição intencional de soro de leite é um problema que vem preocupando as autoridades nacionais e internacionais. Isso ocorre em consequência do baixo valor comercial do soro, seu reduzido aproveitamento em derivados e subprodutos lácteos e do alto custo para seu descarte.

De acordo com as projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2008), para o agronegócio mundial e para o Brasil, entre os derivados do leite, o queijo é o que apresenta maior volume de produção. A produção mundial deverá aumentar para 21,3 milhões de toneladas em 2016.

Segundo RICHARDS (1997), a quantidade do soro gerada no processo de fabricação de queijo é função do tipo de queijo produzido e das técnicas de fabricação empregadas, mas em média, para a fabricação de um quilo de queijo necessita-se de dez litros de leite e, dependendo da água utilizada na fabricação, recuperam-se de nove a doze litros de soro.

A adição fraudulenta de soro de leite ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do caseinomacropéptido (CMP), um fragmento hidrofílico da k-caseína, liberado pela ação da quimosina durante a coagulação enzimática do leite que permanece solúvel no soro, e que deve estar ausente no leite.

O CMP pode ser inespecificamente quantificado através da determinação espectrofotométrica, baseada na reação do ácido siálico presente no CMP, com *p*-dimetilaminobenzaldeído ou ninidrina ácida, formando complexos coloridos. Ele pode também ser determinado por métodos cromatográficos, tais como CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em fase reversa (FR), cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica. Mais recentemente, métodos que utilizam eletroforese capilar têm sido usados com sucesso na identificação e quantificação deste caseinomacropéptido em leites.

Porém a atividade proteolítica de enzimas termorresistentes, liberadas por bactérias psicrotróficas, em leite cru e as que permanecem ativas em leite UAT (Ultra Alta Temperatura), pode acarretar na liberação e surgimento de certa quantidade de CMP e um pseudo-CMP. Isto devido à capacidade, embora não tenham especificidade, das enzimas proteolíticas de hidrolisar a caseína em locais parecidos com os locais hidrolisados pela quimosina.

A quimosina é uma enzima usada na produção de queijo. Ela hidrolisa especificamente a ligação 105-106 da  $\kappa$ -caseína, gerando dois peptídeos diferentes: o para- $\kappa$ -caseína (fragmento 1-105 da  $\kappa$ -caseína) que fica retido na massa do queijo, e outro é a parte residual da caseína, o CMP (fragmento 106-169 da  $\kappa$ -caseína), que vai para o soro (MOLLÉ e LÉONIL, 1995).

As proteinases psicotróficas hidrolisam a caseína na ligação 105-106, levando a formação do CMP, apesar de serem menos específicas que a quimosina e também clivam as ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108. O pseudo-CMP pode diferir do CMP por um único aminoácido (metionina terminal no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107). O pseudo-CMP apresenta um aminoácido a menos que o CMP (fragmento 106-169 da  $\kappa$ -caseína) (RECIO et. al., 2000). Assim, a liberação deste pseudo CMP pode ocorrer naturalmente no leite nas condições de estocagem e transporte, sendo que vários fatores, tais como tempo pós-ordenha e condições de transporte, interferem na sua liberação. Deste modo, toda análise baseada na identificação da CMP pode resultar na classificação errônea das amostras, ou seja, resultados falso-positivos, quanto à adição ao leite, de outra quantidade de soro de leite. A presença de concentrações de CMP de até 30 mg/L, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 mg/L e 75 mg/L, este poderá ser destinado, apenas, à produção de derivados lácteos. Quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg/L, este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral, de acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 69, de 13 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

Isso porque tanto o leite com a adição de soro de leite como o leite cultivado por psicotróficos, que apresentam concentração de CMP acima de 30 mg/L já pode ser considerado leite fraudado ou de má qualidade.

O objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento de um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a um Espectrômetro de Massa para quantificar a adulteração de leite com soro de leite, e diferenciação da proteólise causada por enzimas termorresistentes produzidas por bactérias psicotróficas.

## 2- OBJETIVOS

- Desenvolver método de análise empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por espectrometria de massa para a determinação da fraude de leite com soro de leite e determinação de proteólise causada por enzimas termorresistentes produzidas por *Pseudomonas fluorescens*.
- Comparar metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Filtração em Gel para a determinação da fraude de leite com soro de leite e proteólise causada por enzimas termorresistentes produzidas por *Pseudomonas fluorescens*.

## 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 – Leite UAT

O leite, sob o aspecto nutricional, é considerado um dos alimentos mais equilibrados e completos. É consumido em todas as partes do mundo, tanto na sua forma líquida como na forma de seus mais diversos derivados, proporcionando o atendimento de grande parte de nossas necessidades diárias (CALDEIRA et al., 2006).

Entende-se por leite UAT (Ultra Alta Temperatura), o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

O tratamento UAT tem sido amplamente adotado em laticínios, sendo bastante aceito pelos consumidores, devido às facilidades de estocagem à temperatura ambiente e maior vida de prateleira. Isso possibilita a inclusão do leite na compra mensal do consumidor, não necessitando adquiri-lo diariamente como o leite pasteurizado (VIEGAS et. al. 2006).

A crescente produção e consumo do leite UAT no Brasil, tem despertado, cada vez mais, o interesse por pesquisas relacionadas à qualidade desse produto. Este controle de qualidade deve ser realizado através de periódicas avaliações da composição

físico-química e microbiológica para, assim, obter-se uma idéia sobre a qualidade da matéria prima empregada e a eficiência do processamento térmico (COELHO, 2000).

### **3.2 – Importância das bactérias psicrotróficas na proteólise do leite**

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura, podendo ser divididos em psicrófilos, mesófilos, termófilos.

Microrganismos psicrófilos são aqueles que têm temperatura de multiplicação entre 0 °C e 20 °C, com um ótimo entre 10 °C e 15 °C. Os mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria dos microrganismos acidificantes no leite, e podem ser caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20 °C e 45 °C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 40 °C. As bactérias termófilas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 45 °C e 65 °C, e para algumas espécies consideradas como termófilos extremos as temperaturas de crescimento podem atingir 90 °C e o mínimo em torno de 35 °C (LORENZETTI, 2006).

O termo psicrotrófico foi introduzido em 1960 e melhor definido em 1976 pela FIL (Federação Internacional de Laticínios) como microrganismos que tem a capacidade de crescer a 7°C ou menos sem considerar sua ótima temperatura de crescimento (HAJDENWURCEL, 2004).

Os psicrotróficos são potencialmente a causa mais importante de produtos com baixa qualidade, constituindo-se como fator limitante do tempo de estocagem do leite cru com os procedimentos de manipulação. Na indústria de laticínios, onde grandes volumes de leite ficam armazenados à temperatura de refrigeração entre 1 a 6 °C por longos períodos, as bactérias psicrotróficas encontram condições ótimas para o seu desenvolvimento, e podem provocar mudanças indesejáveis no leite e nos seus derivados (LORENZETTI, 2006).

A implementação da estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil, na década de 90, sendo obrigatória, com exceções (até duas horas após a ordenha do leite), pelo Ministério da Agricultura em 2002 (BRASIL, 2002).

O uso de refrigeração tem sido adotado em todos os níveis de processamento do leite na indústria. A introdução de tanques isotérmicos na fazenda permite estocar o leite de várias ordenhas. A descentralização dos postos de leite permitiu seu transporte refrigerado em caminhões tanques por longas distâncias. Os problemas relacionados com o crescimento da microflora mesofílica foram muito reduzidos. Esta condição, no

entanto, seleciona o desenvolvimento de organismos psicotróficos, os quais têm considerável poder de deterioração. A maioria das bactérias psicotróficas não é patogênica, mas quando cresce no leite ou em produtos lácteos, podem produzir uma série de problemas inclusive proteólise descontrolada, problemas de textura, de aromas e sabores desagradáveis (FUKUDA, 2003).

Além dos cuidados em relação à obtenção do leite, salienta-se a temperatura e o tempo de estocagem, pois se o leite permanecer por um longo período em tanques com temperatura de aproximadamente 4°C, causa a multiplicação dos psicotróficos (FAGUNDES et.al., 2006). Em temperaturas de estocagem mais elevadas do que 4°C, entre 5° a 10°C, o tempo necessário para que as bactérias psicotróficas atinjam aumento rápido de sua população é menor do que 48 horas. Essas condições podem causar o aumento da proteólise. Na maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5 a 10°C, o que configura, um “resfriamento marginal do leite”, contribuindo para multiplicação de microrganismos psicotróficos (FONSECA e SANTOS, 2000).

A maioria dos microrganismos psicotróficos presentes no leite e em derivados é proveniente do solo, da água e da vegetação. Entretanto a principal fonte de contaminação de leite e derivados com bactérias psicotróficas continua sendo os utensílios e equipamentos, que não foram eficientemente lavados e sanitizados, utilizados no manuseio de leite nas fazendas e nas usinas de beneficiamento (ALVIM, 1992).

Uma importante característica dos psicotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (CUNHA e BRANDÃO, 2000). As bactérias psicotróficas, aparentemente, não são significativas quanto à proteólise a menos que a população exceda 10<sup>6</sup> UFC/mL (FOX, 19 89).

As proteases são produzidas por uma série de bactérias psicotróficas, sendo predominantemente bastonetes Gram negativos responsáveis pela deterioração do leite (FUKUDA, 2003).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre as produtoras de enzimas hidrolíticas e as proteases e lipases produzidas por elas já estão bem caracterizadas

(CARDOSO, 2006). Esse gênero inclui espécies que apresentam um tempo de geração curto entre 0 °C e 7 °C, e uma temperatura mínima de crescimento baixa, de até - 10 °C (SORHAUG e STEPANIAK,1997).

As espécies mais comuns de psicrotróficos encontrados no leite são as *Pseudomonas* spp; particularmente *Pseudomonas fluorescens*. As proteases provenientes das *Pseudomonas* podem degradar as caseínas  $\kappa$ ,  $\beta$  e  $\alpha$ , enquanto as proteínas do soro não são afetadas por essas enzimas (SHAH, 1994).

Em um trabalho de revisão DATTA e DEETH (2001) reportaram que as proteinases estáveis ao calor produzido por contaminantes bacteriana psicrotróficas do leite cru, também são capazes de causar gelificação do leite UAT. LAW et al (1977) investigaram a gelificação do leite UAT por proteinases a partir de estirpes de *Pseudomonas fluorescens* isoladas do leite cru e concluiu que elas conduziram a formação de um gel em um tempo dependente do grau de crescimento do organismo, antes do tratamento térmico.

(DATTA e DEETH, 2001) relataram que os fragmentos peptídicos resultantes dessa proteólise possuem massa molar semelhantes ao do CMP, ou seja, um pseudo-CMP. O pseudo-CMP difere do CMP por um único aminoácido (metionina terminal no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107). Porém algumas proteases de *P. fluorescens* também podem produzir certa quantidade de CMP (RECIO et. al, 1996 a).

Segundo DESAMASURES e GUEGUEN (1997), em extenso trabalho relatando os resultados do monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado, apontaram os microrganismos psicrotróficos do gênero *Pseudomonas* como os mais importantes em termos de contaminação microbiológica. Outros microrganismos isolados neste estudo foram lactococos, lactobacilos e leveduras. Esse gênero inclui espécies que se caracterizam por apresentar alta diversidade genética e mecanismos fisiológicos de adaptação e crescimento a baixas temperaturas (LORENZETTI, 2006).

Vários problemas de qualidade de produtos lácteos podem estar associados à ação de proteases e lipases de origem microbiana como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelificação do leite longa vida (KOHLMANN et al., 1991 a). Essas enzimas estão relacionadas também com defeitos sensoriais (DOGAN e BOOR, 2003), instabilidade térmica do leite (ADAMS et al., 1975), e redução no rendimento na produção de queijos (STOFER e HICKS, 1983).

### 3.3 - Métodos de monitoramento da proteólise do leite

Os métodos mais empregados no estudo da proteólise foram os baseados na determinação de nitrogênio solúvel (método Kjeldhal), elemento liberado quando a proteína é hidrolisada, utilizando para isto um agente de precipitação (por exemplo, o ácido tricloroacético), e na determinação de grupamentos  $\alpha$ -amino livres e aminoácidos aromáticos, com destaque para os métodos de Hull e TNBS (Trinitrobenzenosulfona). Entre esses métodos, a determinação de nitrogênio é o de menor sensibilidade na detecção de proteólise em leite, sendo desta forma pouca empregado atualmente.

O emprego do reagente trinitrofluorbenzeno (TNBS) na estimativa da proteólise do leite foi avaliado por McKELLAR (1981), em um estudo que buscou correlacionar o grau de proteólise do leite (pasteurizado e UAT) com o aparecimento de sabor não característico (“off-flavor”) nos produtos. O autor salienta que essa metodologia é capaz de monitorar a proteólise de leite UAT estocados em razão de sua capacidade de medir pequenos aumentos de grupamentos  $\alpha$ -amino livres no início da estocagem, e com esses dados é possível preestabelecer o tempo de vida útil do produto. Todavia esse procedimento analítico apresenta algumas desvantagens como: duração da análise, a contaminação do reagente pelo ácido pícrico promove uma elevação dos valores do “branco” e a interferência de alguns componentes como, açúcares e a amônia (SILVESTRE, 1997)

O procedimento que utiliza o reagente ninidrina baseia-se na reação do composto com grupamento  $\alpha$ -amino livres, promovendo o aparecimento de cor, cuja intensidade pode ser medida por espectrofotometria à 570 nm (GOMES, 1996). Embora seja um método de boa sensibilidade, ele apresenta algumas deficiências como alta sensibilidade à ação de oxigênio e o tempo de duração da análise é extenso devido as etapas de aquecimento e resfriamento, necessárias para formação do cromóforo (SILVESTRE, 1997).

O ácido N-acetilneuramínico (NANA ou ácido siálico), componente do caseinomacropéptídeo (CMP), pode ser utilizado no monitoramento da proteólise do leite. GOMES (1996) empregou o método de ninidrina ácida, inicialmente desenvolvido para detecção de fraude de soro em leite (FUKUDA, 1992), para avaliação da proteólise de leite UAT, obtendo bons resultados. MOTTAR *et al.* (1985) comparando os níveis de certos produtos da proteólise do leite devido à ação de proteases bacterianas, determinado pelo método de cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE), com os

valores de ácido siálico nas mesmas amostras, observou uma correlação significativa entre esses compostos (superior a 0,8,  $p < 0,001$ ). Entretanto o método do ácido siálico sofre interferências de leite oriundo de vacas com mastite.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido muito usada nos dias atuais, na análise de detecção do CMP que apresenta massa molar em torno de 8000 Daltons, possibilitando sua separação dos demais peptídeos do leite, por meio de colunas de CLAE – filtração gélida. O método consiste num sistema de bombeamento isocrático, sendo a fase móvel constituída de uma solução tampão fosfato, em pH 6,0. A coluna utilizada geralmente é a ZORBAX GF 250 (Du Pont), cujo princípio de separação baseia-se na exclusão molecular. A detecção se dará por espectrofotometria no UV, no comprimento de onda de 205 nm, sendo os compostos quantificados por integração eletrônica das áreas dos picos (ALVIM, 1992). A análise de CLAE-filtração gélida pode ser realizada conforme a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 68, de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006).

Um artigo de revisão redigido por GONZALEZ-LLANO et al. (1990) relata o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência na avaliação de compostos nitrogenados em produtos lácteos. Segundo os autores, essa metodologia caracteriza-se pela versatilidade, tempo de análise relativamente curto, boa resolução e eficiência na separação dos componentes.

Para análise da proteólise em leite e derivados tem se empregado CLAE em fase reversa e filtração gélida (MOTTAR et al., 1985), LOPEZ-FANDIÑO et al., (1993). RECIO et al. (1996 b) utilizaram UAT em fase reversa para determinar o local da hidrólise da  $\kappa$ -caseína pela quimosina e enzimas microbianas. Eles foram capazes de obter a separação das variantes genéticas A e B da  $\kappa$ - caseína através da precipitação com TCA 4%. Todavia essa metodologia apresenta algumas dificuldades em seu emprego em escala industrial, devido ao custo relativamente elevado em sua implantação e a necessidade de pessoal treinado, por não ser uma técnica de fácil execução.

Os principais peptídeos oriundos da ação de proteinases de bactérias psicrotróficas sobre a  $\kappa$ -caseína foram separados por cromatografia de fase reversa e eletroforese capilar e identificados por espectrometria de massa com ionização por eletrospray em estudos realizados por RECIO et al. (2000 b). Foi observado uma coincidência com os produtos de degradação previamente encontrados em leite UAT estocado. Os resultados demonstraram que as proteinases psicrotróficas hidrolisam a

caseína na ligação 105-106, levando a formação do CMP, apesar de serem menos específicas que a quimosina e também clivam as ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108. Sendo assim, a presença de CMP em leite UAT pode não ser considerada indicador exclusivo de adulteração do leite com soro de leite.

Outro método de análise de CMP, a eletroforese capilar, é um sistema eletroforético que apresenta algumas vantagens em relação aos procedimentos convencionais de eletroforese. Esse método utiliza pequenos tubos capilares, com diâmetros internos variando entre 20 a 200  $\mu\text{m}$ , e altas voltagens (20 a 25 kV), o que permite a separação eficiente, com boa resolução, tanto de pequenas como grande moléculas protéicas. Alguns pesquisadores, atualmente, têm empregado essa técnica analítica para monitoramento da proteólise de leite UAT, recomendando-a tanto para trabalhos de pesquisa como no controle de qualidade de produto em escala industrial, em razão de sua ótima resolução, fácil execução e rapidez de análise (RECIO et al., 1996b).

JONG *et al.*, (1993) concluíram que a eletroforese capilar é uma técnica de grande potencial na avaliação das proteínas do leite, sendo capaz de realizar centenas de análises, em razão da boa durabilidade do tubo capilar empregado para essa finalidade.

Algumas pesquisas desenvolveram testes imunoenzimáticos, com destaque a “Prova Imunoabsorvente ligada à Enzima” (ELISA), com a finalidade de estimar o grau de proteólise do leite. Para avaliação desse fenômeno, os métodos já desenvolvidos baseiam-se na quantificação dos produtos da proteólise, principalmente o CMP ou GMP, ou das proteases bacterianas encontradas no leite (PICARD *et al.*, 1994).

SYMONS & EWINGS (1990), empregando anticorpos monoclonais produzidos a partir de proteases de estirpes da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, desenvolveram um método ELISA para acompanhar a proteólise do leite com sensibilidade para detectar níveis de até 3,0 ng da protease bacteriana por mililitro de leite. De acordo com um estudo realizado anteriormente, níveis reduzidos de proteases (3 a 30 ng/mL de leite) podem causar o aparecimento de gelatinização do leite UAT após a estocagem durante 3 a 15 dias à temperatura de 23 °C (MITCHEL e EWINGS, 1985).

PICARD *et al.* (1994) desenvolveram um teste ELISA para detecção de CMP em leite com a finalidade de avaliar extensão da proteólise da k- caseína em razão da ação de enzimas proteolíticas de microrganismos psicrotóxicos em leite cru estocado à temperatura de refrigeração. O ensaio utilizou um peptídeo sintético similar ao CMP como antígeno e o limite de detecção do teste foi de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e com um coeficiente de

variação menor que 10%. Posteriormente essa metodologia foi empregada para avaliar o grau de proteólise do leite cru e UAT. Segundo os pesquisadores, o leite UAT não deve se gelatinizar quando o nível de CMP no leite cru for inferior a 5 µg/mL de leite (PICARD *et al.*, 1996).

### 3.4- Caseinomacropéptídeo

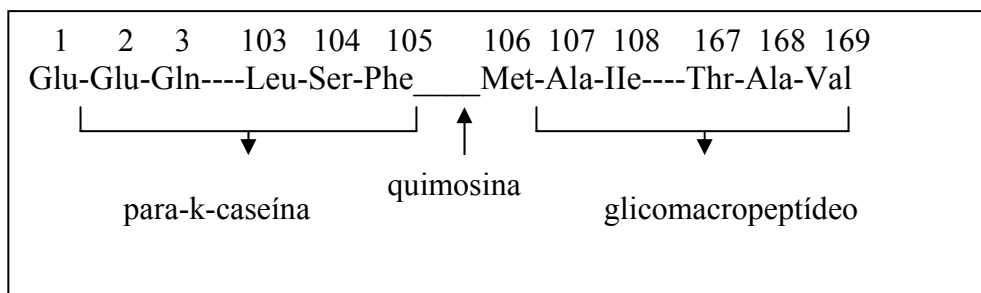
A caseína (CN) constitui a principal fração protéica do leite, tanto pela sua concentração como por se tratar de uma proteína de alta qualidade biológica.

As caseínas do leite de vaca são compostas por aproximadamente 50%  $\alpha$ -caseína (incluindo a  $\alpha_{s1}$ - caseína e  $\alpha_{s2}$ - caseína ), 30% de  $\beta$ -caseína, 15% de  $\kappa$ -caseína e 5% de  $\gamma$ -caseína (BURAGLIA, 2001).

A  $\kappa$ -caseína é a fração mais solúvel das caseínas, na presença de uma ampla faixa de concentração do íon de cálcio. Ela representa 15% do total de caseínas, atuando como agente estabilizador da micela de caseína. É constituída por um polipeptídico de 169 aminoácidos (DRACZ, 1996).

GOURSAUD (1985) citado por ALVIM (1992) verificou que existem duas variantes genéticas da  $\kappa$ -caseína, A e B. Essas variantes constituem uma massa molar equivalente a, aproximadamente, 19.000 Daltons. A variante A ( $\kappa$ -CN A) difere da variante B ( $\kappa$ -CN B) pela substituição de um resíduo de treonina por isoleucina na posição 136 e de um resíduo de ácido aspártico por alanina na posição 148 (ASCHAFFENBURG, 1968).

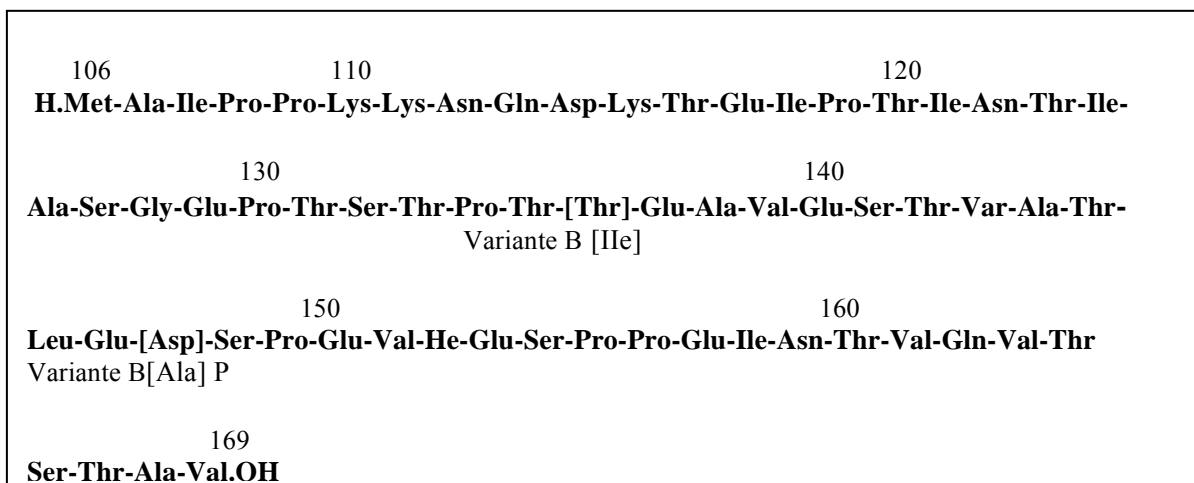
Diversas enzimas proteolíticas hidrolisam a  $\kappa$ -caseína, merecendo atenção especial a quimosina (EC.3.4.23.4) que a hidrolisa entre os aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106) (FOURNET *et al.*, 1979). Dois fragmentos ou peptídeos são produzidos desta hidrólise: um N-terminal denominado para- $\kappa$ -caseína (aminoácidos 1-105); e um outro solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 8%, denominado caseinomacropéptídeo (aminoácidos 106-169), que contem em sua estrutura diferentes teores de fosfato e carboidratos (VREEMAN *et al.*, 1986). A Figura 1 representa o local da ação da quimosina na  $\kappa$ -caseína.



FONTE: FENNEMA (2000)

**Figura 1-** Local da ação da quimosina na  $\kappa$ -caseína

O Caseinomacropéptido (CMP) é um polipeptídeo de 64 resíduos de aminoácido (106-169) derivado da parte C-terminal da  $\kappa$ -caseína bovina. É libertado pela ação da quimosina (EC 3.4.23.4) durante a fase primária da coagulação do leite (MOLLÉ e LÉONIL, 1995). O caseinomacropéptido é um dos inúmeros nomes para os peptídeos resultantes da quebra da  $\kappa$ -caseína. O peptídeo é também conhecido como glicomacropéptido (GMP), caseinoglicomacropéptido (CGMP), ou peptídeo derivado da caseína (CDP). Geralmente, costuma-se denominar de GMP a forma glicosilada, devido ao seu elevado conteúdo de carboidratos, e CMP a forma não glicosilada do peptídeo (TULLIO, 2007). Na Figura 2 é apresentada a estrutura primária do GMP.



FONTE: BRODY (2000)

**Figura 2-** Estrutura primária do glicomacropéptido

No Quadro 1, encontra-se a composição teórica dos aminoácidos encontrados no GMP.

**Quadro 1-** Composição teórica de aminoácidos presentes no glicomacropéptido

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA	VALOR TEÓRICO* (%)
Ácido aspartico	Asp	8,5
Treonina	Thr	18,2
Serina	Ser	7,8
Ácido Glutâmico	Glu	19,2
Glicina	Gly	0,9
Alanina	Ala	5,3
Valina	Val	8,9
Metionina	Met	2,0
Isoleucina	Ile	10,1
Leucina	Leu	1,7
Tirosina	Tyr	0
Fenilalanina	Phe	0
Histidina	His	0
Lisina	Lys	5,7
Arginina	Arg	0
Prolina	Pro	11,6

FONTE: CHU, MACLEOD, OZIMEK (1996)

\* Valor Teórico calculado conforme a estrutura primária do GMP

CMP derivado da  $\kappa$ -caseína é muito heterogêneo, podendo apresentar quatro variações genéticas; A, B, C e E. As formas A e B (CMP<sub>A</sub> e CMP<sub>B</sub>, respectivamente) são as variantes mais comuns da  $\kappa$ - caseína do leite de vaca. As variantes CMP<sub>A</sub> e CMP<sub>B</sub> podem estar na forma glicosilada, ou aglicosilada. As formas A e B do aglico-CMP, tem massa molar de 6787 e 6755 Daltons, respectivamente. A média da massa molar do CMP total é aproximadamente 7500 Da podendo ser encontrado valor mais alto de até 9631 Da (MOLLÉ e LÉONIL, 2005). A forma glicosilada representa 50-60% do CMP total e é composta por Gal (galactose), GalNAc (N-acetilgalactosamina), NeuAc (ácido acetilneuramínico), sendo este último conhecido como ácido siálico, é o que mais predomina (THOMÄ, KRAUCE, KULEZIK, 2006). Estudos de DALGLEISH (1986) mostraram que a ação da renina sobre as variáveis genéticas A e B independe da região glicosilada da proteína, presente na micela. Ele encontrou ainda que a concentração do CMP liberado não varia com a proporção entre as variantes genéticas A e B da  $\kappa$ - caseína.

CHERVOVA et al. (1988) determinaram a estabilidade térmica, a composição aminoácídica e o peso molecular do CMP, concluindo que sua estabilidade térmica elevada é principalmente devido ao elevado conteúdo de ácido siálico em sua estrutura.

O CMP esta presente no soro de leite na concentração de 1,2 g/L a 1,5 g/L, e é rico em aminoácidos de cadeia ramificada (valina e isoleucina) e livre de aminoácidos aromáticos (OLIVA, ESCOBAR, PONCE, 2002).

O principal pseudo-CMP (CMP oriundo da proteólise da  $\kappa$ -caseína por enzimas produzidas por bactérias psicrotróficas) difere do CMP por um único aminoácido (metionina terminal no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107). Este pseudo-CMP apresenta um aminoácido a menos do que o CMP. Porém algumas proteases de *P. fluorescens* também podem produzir certa quantidade de CMP (RECIO et. al., 1996 a).

### **3.5- Efeito da Concentração de Ácido Tricloroacético (TCA) na Solubilização do CMP**

O ácido tricloroacético (TCA) é utilizado em diversas concentrações para separar peptídeos de proteínas, por diferença de solubilidade. A natureza heterogênea do material nitrogenado solúvel, liberado da  $\kappa$ -caseína pela ação da quimosina, foi sugerido por ALAIS et al. (1953), que reportaram que a quantidade de nitrogênio não proteico (NPN) recuperado varia com a concentração de TCA usado como agente precipitante.

ARMSTRONG et al. (1967) observaram que o material solúvel formado pela ação da quimosina sobre a  $\kappa$ -caseína consiste de uma série de macropeptídeos e que estes podem ser fracionados por precipitação quando se usam concentrações crescentes de TCA. De acordo com os resultados, concluíram que a solubilidade do CMP em TCA está relacionada com o conteúdo de carboidrato do peptídeo. A porção solúvel em TCA 12% compreende os peptídeos menores, mais negativamente carregados e ricos em carboidratos.

HOOYDONK e OLIEMAN (1982) realizaram ensaios com CMP derivado da  $\kappa$ -caseína e com soro de leite, verificando que a concentração final ótima de solução de TCA para o preparo das amostras a serem analisadas por CLAE, é de 8%. Usando esta concentração de TCA, as caseínas e as proteínas do soro são precipitadas. Concentrações mais baixas de TCA resultam em uma ineficiente remoção de proteínas e concentrações maiores que 8% causam um aumento na precipitação do CMP.

HOOYDONK et al. (1984) relataram que a solubilidade do CMP em TCA é dependente da carga e do teor de carboidratos. Os peptídeos mais negativamente carregados ou ricos em carboidratos são os mais solúveis em TCA, sendo que a solubilidade do CMP decresce substancialmente com o aumento da concentração do ácido, pois cerca de 50% do CMP é solúvel em TCA 8% e somente cerca de 25% em TCA 12%.

YVON et al. (1992) estudaram os mecanismos de precipitação dos peptídeos em TCA. Concluíram que o ácido interage com os peptídeos, induzindo o aumento da hidrofobicidade destas frações protéicas. O aumento da hidrofobicidade pode levar à agregação dos peptídeos. Os fatores que condicionam a solubilidade de um peptídeo são: tamanho (número de resíduos ou massa molar), hidrofobicidade e carga em pH ácido. Baseados em seus resultados, concluíram que não é possível firmar uma relação entre o tamanho do peptídeo e sua solubilidade. Entretanto, todo peptídeo contendo menos que 7 resíduos de aminoácidos foram solúveis nas concentrações de TCA utilizadas (2, 4, 8 e 12%). Este resultado pode ter algum interesse prático, como por exemplo, na análise de hidrolisados comerciais contendo pequenos peptídeos utilizados na alimentação parenteral. Os autores observam que a solubilidade do peptídeo em TCA decresce, tanto com o aumento da concentração de TCA quanto com o aumento da concentração do peptídeo, e sugere que este fato é devido à competição entre moléculas de TCA e de água.

### **3.6-Métodos para a detecção de fraude de leite com soro de leite**

Um dos métodos utilizados para quantificação do CMP detecta a presença do ácido siálico, também denominado NANA (ácido N- acetil neuramínico), um dos carboidratos ligados ao CMP, que pode ser dosado quantitativamente por meio da densidade ótica a 549 nm de acordo com WARREN(1959). Este método foi modificado por WOLFSCHOON-POMBO e PINTO (1985) substituindo o agente complexante resorcinol proposto por WARREN (1959) pelo reagente de Erlich. O método modificado permite detectar adulteração de leite fresco pasteurizado com, no mínimo, 2% de soro de leite, porém demanda um tempo excessivo de análise. Outra desvantagem deste método é que pode ainda sofrer interferência causada por leite de vacas com mastite, interferência causada pela presença de células somáticas ao leite.

HOOYDONK e OLIEMAN (1982) desenvolveram um método de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho por filtração gélica (CLAE-FG), com o

objetivo de acompanhar a ação da renina no leite. O método permite quantificar o CMP liberado no comprimento de onda de 205 nm. OLIEMAN e BEDEM (1983) utilizaram o mesmo método para quantificar a adição de sólidos de soro de queijo ao leite em pó, este método foi adotado como oficial pelo Mercado Comum Europeu (MCE). BRANDÃO et al. (1988) empregaram o método de CLAE-Filtração gélica para a análise de amostras de leite pasteurizado, tipo C, comercializado em alguns estados do Brasil. Constataram que, partes destas amostras, foram adicionadas de soro de leite.

VILELA (1987) desenvolveu um método de detecção de CMP em leite em pó e leite pasteurizado utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para realizar a separação, e densitometria para quantificação. Apesar da metodologia apresentar alta sensibilidade (0,5% de soro de queijo adicionado), o tempo total de análise pode ser considerado longo, quando comparado com a técnica de CLAE-filtração em gel.

Em experimentos, conduzidos por OLIEMAN e RIEL (1989), utilizou-se CLAE em coluna de fase reversa (CLAE-FR) para estudar o comportamento da proteólise extensa no leite, causada por bactérias psicrotróficas. Em 1990, este método foi considerado oficial para a detecção de soro de queijo em amostras de leite pelo MCE.

ALVIM (1992) fez um estudo da influência da qualidade do leite nos resultados do método de CLAE-FG, quando utilizado para detectar soro de leite adicionado neste produto, e concluiu que os resultados positivos, quanto à presença de CMP, podem ser interpretados como a adição de soro ao leite, ou como provenientes da detecção de produtos oriundos de proteólise excessiva causada por *Pseudomonas*. O Ministério da Agricultura brasileiro adotou este método como oficial em 1991 (Portaria nº 124, de 23 de setembro de 1991 e republicada em 20 de novembro de 1991 no Diário Oficial da União, pag. 26245-26246).

MOLLÉ e LÉONIL (1995), realizaram o primeiro uso de dois métodos combinados, CLAE-FR e Espectrometria de Massa, para a análise e caracterização do CMP. Através dos resultados obtidos eles concluíram que a utilização destes métodos combinados oferece uma alternativa muito promissora para a análise de misturas complexas, especialmente quando há algumas dificuldade em separação apenas por CLAE.

NONI e RESMINI (2005) utilizaram CLAE- espectrometria de massa de ionização por electrospray para detectar presença de CMP A, presente na fase aquosa da

manteiga, proveniente de uma possível adição de soro na fabricação de manteiga. Foi analisado creme fresco e creme maturado. Resultados demonstraram que aqueles peptídeos diferentes do CMP<sub>A</sub>, que interferem no perfil de CLAE, podem ter sido formados no creme depois da maturação prolongada com culturas starters de bactérias ácidas lácticas. Além disso, proteólise causada por *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 foi estudada no creme de leite. Neste caso, peptídeos diferentes, inclusive CMP<sub>A</sub>, são liberado da  $\kappa$ -caseína quando a flora bacteriana atingir mais de  $>10^6$  UFC/g. Por estas razões, só a Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (CL/EM) pode mostrar inequivocamente a presença compostos de CMP<sub>A</sub> e então o uso de soro de leite na fabricação de manteiga.

O método de CLAE- espectrometria de massa de ionização por electrospray proposto por NONI & RESMINI (2005) provou ser seguro e não foi afetado por fenômenos de proteólise que podem acontecer no creme durante a fabricação de manteiga. Somente contaminação inaceitável do creme através de bactérias psicotróficas pode produzir CMP<sub>A</sub> e então não fornecer um resultado falso- positivo.

MOLLÉ e LÉONIL (2005) propuseram um métodos para quantificação do aglico-CMP<sub>A</sub> e CMP total (incluindo as formas aglico e glicosiladas) em diferentes tipos de produto de leite comercial usando CLAE-FR com detecção por espectrometria de massa de ionização por eletrospray. Análises quantitativas por Espectrometria de Massa (EM) foram baseadas na detecção de íons específicos carregados de aglico-CMP<sub>A</sub> e de aglico-CMP<sub>B</sub>. Devido ao alto grau de sensibilidade e seletividade da espectrometria de massa, fica possível detectar fragmento de íons característicos de CMP, permitindo a sua identificação não ambígua em produtos de leite.

Diversos outros métodos têm sido estudados e propostos para a detecção da adulteração do leite com soro de leite. Estes métodos exigem excessivo trabalho laboratorial, longo tempo de análise, e apresentam baixa sensibilidade.

FENG e CUNNINGHAM-RUNDLES (1989) relataram a produção de anticorpo monoclonal contra a  $\kappa$ -caseína, o qual foi testado por "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) e demonstrou ser específico contra a  $\kappa$ -caseína bovina. Por radioimunoensaio,  $0,3 \times 10^{-4}$  nM/ml de  $\kappa$ -caseína pode ser detectada. O anticorpo não mostrou interação com outras proteínas do leite e nem contra  $\kappa$ -caseína humana, contra a qual também foi testado.

O isolamento de dois anticorpos monoclonais contra a  $\kappa$ -caseína bovina foi relatado por KUZMANOFF et al. (1990). Os anticorpos foram utilizados para mapear a

região do epítopo da proteína. O estudo demonstrou que o reconhecimento do sítio de ligação pelo anticorpo pode ser dependente das estrutura terciária e não simplesmente da estrutura primária da  $\kappa$ -caseína. Demonstram ainda, que quando se tratou a  $\kappa$ -caseína com quimiosina, as frações solúvel e insolúvel foram reconhecidas pelos anticorpos, o que sugere que regiões semelhantes podem estar presentes em ambas as frações. Após a remoção dos carboidratos, um dos anticorpos mostrou um aumento no grau de interação com a  $\kappa$ -caseína. Os autores sugerem que a seqüência de aminoácidos (Pro-Thr-Thr) que aparecem nas posições 92 a 94 e 134 a 136 representaria o possível sítio de ligação dos anticorpos. As posições 131, 133, 135 e 136 são reconhecidas como os sítios de ligação dos carboidratos na molécula da  $\kappa$ - caseína.

PICARD et al. (1994) desenvolveram um ensaio imunoenzimático por ELISA para detecção de CMP em leite com a finalidade de estimar a proteólise da K-caseína devido a ação de enzimas de bactérias psicrotóficas em leite cru estocado a baixa temperatura. O ensaio foi desenvolvido utilizando-se um peptídeo sintético de 11 aminoácidos, representativo da região N terminal do CMP bovino, como imunógeno. O peptídeo sintético foi conjugado com uma proteína carreadora pela sua parte C terminal, e o antissoro foi obtido em coelhos. O limite de detecção de CMP em leite foi de 0,1 g/ml.

DRACZ (1996), desenvolveu um método imunoenzimático para determinação de soro de leite adicionado ao leite. A Técnica “imunodot-blot” desenvolvida, em razão da sua grande sensibilidade, se mostrou adequada para a detecção de soro de leite adicionado ao leite até limite de 1% (v/v) de soro adicionado, esta é uma vantagem do método desenvolvido em relação ao método oficial que utili cromatografia líquida de exclusão molecular.

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Coleta do leite UAT sem CMP**

O leite UAT comercial sem CMP foi coletado em uma indústria de laticínios, no mesmo dia de sua produção, e imediatamente congelado a  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A determinação da isenção de CMP no leite foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Filtração em Gel (CLAE-FG).

## **4.2 - Análises físico-químicas e microbiológicas do leite**

O leite UAT isento de CMP foi submetido às análises físico-químicas (densidade, crioscopia, acidez, sólidos totais e sólidos não gordurosos) e às análises microbiológicas (contagem padrão em placas e contagem de psicotróficos). As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos) (BRASIL, 2006). As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, de 26 de agosto de 2003 (Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água) (BRASIL, 2003). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

## **4.3 - Análises das amostras de leite UAT por CLAE-FG**

Todas as análises para determinação de CMP por CLAE-FG foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida por ALVIM (1992).

Para determinação da concentração de CMP no leite foi usado um cromatógrafo líquido de alto desempenho (CLAE) modelo Prominence da Shimadzu, composto pelos seguintes módulos; Degaseificador DGU- 20A<sub>5</sub>, Bomba Prominence LC 20AT, Injetor automático SIL- 10AF, Interface CBM- 20A e Detector UV – visível SDP 20A.

A coluna cromatográfica utilizada para a análise de CMP por CLAE-FG foi a Zorbax GF-250 (250mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 4 µm) da Agilent.

Foram injetados 20 µL de amostra (conforme método de preparo descrito no item 4.8) para determinar a concentração CMP em leite, sendo a fase móvel tampão fosfato pH 6,0, fluxo de 0,5 mL/min, e detecção por UV no comprimento de onda de 210 nm. A cromatografia transcorreu por 15 minutos e o tempo de retenção do CMP foi em torno de 5,7 minutos.

Os resultados foram integrados usando o Software LC solution.

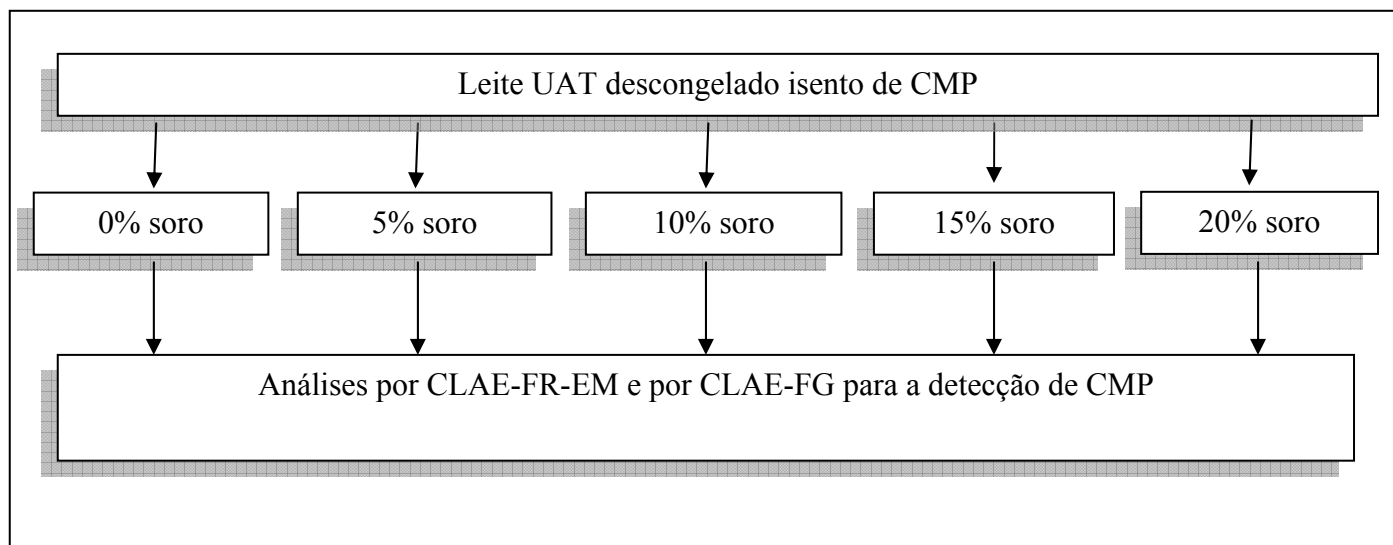
#### **4.4 - Obtenção do soro de leite**

O leite, usado para obtenção do soro de leite, foi proveniente da fazenda modelo do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, localizada em Pedro Leopoldo-MG, coletado no tanque de equilíbrio imediatamente após a ordenha, antes de ser refrigerado no tanque de expansão. A determinação da isenção de CMP no leite foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Filtração em Gel (CLAE-FG). O leite foi submetido ao processo de pasteurização a 72 °C por 15 minutos.

Em 1 L de leite integral não homogeneizado, à temperatura de 32°C, foram adicionados 1 mL de coalho bovino líquido (HA-LA). Após agitação, o leite com o coalho foi deixado em repouso por 40 minutos. Depois o coágulo foi cortado em cubos de 0,5 cm de lado, e agitado lentamente por 30 segundos. A massa foi então deixada em repouso por mais 2 a 3 minutos. A massa foi novamente agitada lentamente, até que o soro estivesse límpido, sem a presença de matéria leitosa. O soro foi finalmente separado, filtrado e pasteurizado a 72 °C/15 minutos, para inativação da enzima do coalho, sendo então resfriado até ser usado.

#### **4.5 - Adição de soro de leite ao leite UAT isento de CMP**

Ao leite UAT sem CMP descongelado, foi adicionado soro de leite pasteurizado nas concentrações de 0; 5; 10; 15 e 20% (v/v). Em seguida amostras deste leite foram tratadas conforme item 4.8 e analisado por CLAE-FR-EM e por CLAE-FG. Com isso foi verificada e comparada a eficiência das duas técnicas na detecção de fraude de leite com soro de leite. A Figura 3 ilustra esta parte do experimento.



**Figura 3-** Esquema do experimento de detecção de fraude de leite com soro de leite por CLAE-FR-EM e por CLAE-FG

#### 4.6- Cultivo do leite UAT sem CMP com *Pseudomonas fluorescens*

Quando necessário o leite UAT sem CMP foi descongelado em banho de água a temperatura de 23 °C.

Em ambiente asséptico, um inóculo de cultura de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL de caldo nutritivo BHI ( infusão de cérebro e coração), previamente esterilizado. Essas culturas foram previamente ativadas em caldo nutritivo BHI a 28 °C ± 1 °C por 48 horas. Após a incubação, 1 mL do caldo BHI foi transferido para uma garrafa de diluição contendo 99 mL de leite UAT descongelado, isento de CMP. A população de *Pseudomonas* deste inóculo foi de 10<sup>3</sup> UFC/mL. O leite UAT sem CMP inoculado com *P. fluorescens* foi incubado a 7 °C ± 1 °C por 48 horas. Em seguida, 1 mL deste leite foi transferido para uma garrafa de diluição contendo 99 mL de leite UAT descongelado isento de CMP, obtendo assim, um inóculo de leite com população de *P. fluorescens* de 10<sup>3</sup> UFC/mL com 0 horas de incubação. Em seguida, 1mL deste inóculo foi transferido para garrafas de diluição contendo 99 mL de leite UAT descongelado, isento de CMP, e incubado em uma BOD a 7 °C ± 1 °C por 2, 4, 6 e 8 dias.

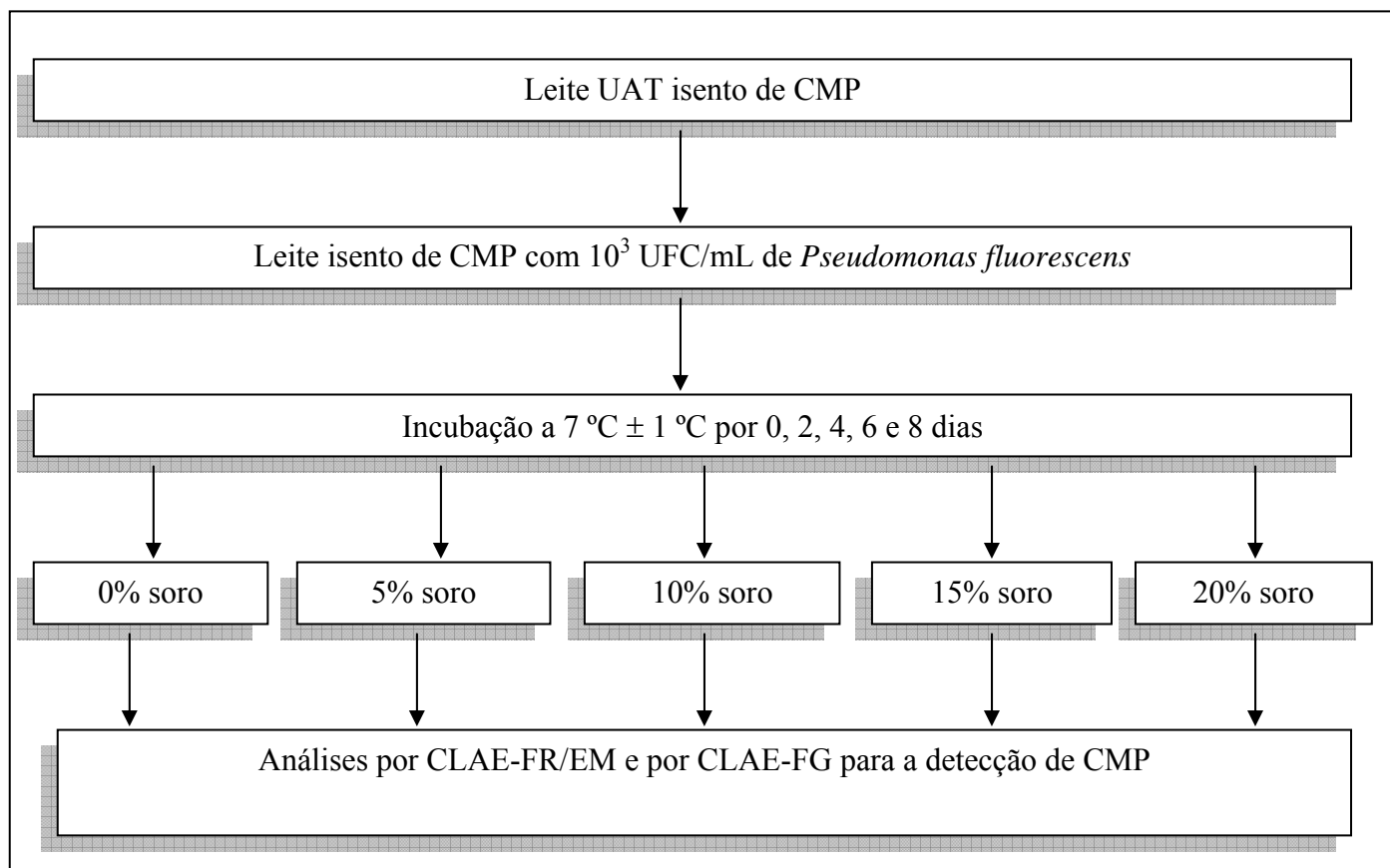
Também após a incubação das amostras de leite por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, foi realizada a contagem em placas da população de bactérias psicrotóficas, utilizando como meio de cultura o Cetrimide, meio seletivo para bactérias psicrotóficas.

#### **4.7- Leite UAT sem CMP adicionado de soro de leite após cultivo com *Pseudomonas fluorescens***

O leite UAT isento de CMP, foi adicionado com o inóculo de *Pseudomonas fluorescens* obtendo um inóculo com população de  $10^3$  UFC/mL. Em seguida foi então incubado em BOD a  $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , por 0, 2, 4, 6 e 8 dias. Após incubação, o leite UAT descongelado foi adicionado de 0, 5, 10, 15 e 20% (v/v) de soro de leite (Figura 4). A seguir, amostras de todos estes leites foram tratadas como no item 4.8 e analisado por CLAE-FR/EM e CLAE-FG.

#### **4.8- Preparo das amostras de leite UAT para análises de CMP por CLAE-FG e CLAE-FR/EM**

Em uma alíquota de 10 mL da amostra de leite foi adicionado 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 24% (m/v) gota a gota e sob agitação constante. As amostras foram deixadas em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro qualitativo. Em seguida o filtrado foi novamente filtrado em membrana Millipore de diâmetro de poro de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ .



**Figura 4-** Esquema do experimento de detecção de fraude de leite com adição de diferentes concentrações de soro de leite por CLAE-FR/EM e por CLAE-FG, após incubação com *Pseudomonas fluorescens*

## 4.9-Detecção de CMP por CLAE-FR/EM

### 4.9.1- Descrição do equipamento

Para as análises da determinação de CMP por CLAE-FR/EM foi usado um cromatógrafo líquido da Agilent Technologies, modelo 1100 Series, com capacidade para gradiente. A coluna utilizada foi a Zorbax 300 SB- C18 (4,6 mm de diâmetro, 150 mm de comprimento e tamanho de partícula de 5 µm). O Detector usado foi um Espectrômetro de Massa da Applied Biosystems, modelo 4000 Q TRAP. O Espectrômetro de Massa compreende um triplo quadrupolo. O API 4000 Q TRAP, foi operado no modo positivo. A ionização das moléculas e a nebulização das amostras foi realizado por electrospray (ESI). O gás de nebulização utilizado foi o Nitrogênio. A temperatura da fonte foi fixada em 450 °C. O vácuo dentro do espectrômetro de massa foi de  $10^{-6}$  mmHg.

Entre o CLAE e o Espectrômetro de Massa foi acoplado uma Válvula VICCI, para descarte inicial da fase móvel com a amostra de leite após a coluna, para evitar

acúmulo de resíduos no Espectrômetro de Massa (posição A). Um pouco antes da saída dos picos do CMP da coluna, a Válvula VICCI é virada automaticamente aos 14 minutos (posição B), e a fase móvel e amostra (conforme método de preparo descrito no item 4.8), agora, começa a ir diretamente para o Espectrômetro de Massa. No tempo de 30 minutos a Válvula VICCI é virada automaticamente (posição A), para o descarte final da fase móvel, até 40 minutos. Esta válvula foi instalada com o objetivo de obter melhores resultados, visto que a amostra injetada estava entupindo a entrada do Espectrômetro de massa, não chegando, assim, sinal suficiente no detector de massa.

O injetor usado foi um injetor automático G1329A da Agilent Technologies 1100 Series. Foram injetadas 20 µL da amostra preparada. A corrida cromatográfica transcorreu por 40 minutos, e tempo de retenção do CMP foi em torno de 20 minutos.

Os resultados dos sinais do Espectrômetro de Massa foram integrados usando o Sistema Analyst versão 1.4.2 Applied Biosystems.

#### **4.9.2-Análises das amostras de leite UAT preparadas para CLAE-FR/EM**

Foram injetados 20 µL de amostra preparadas como no item 4.8. A fase móvel usada foi um gradiente da mistura do solvente A e do solvente B. O solvente A foi água Milli Q contendo 0,1% (v/v) de Ácido Trifluoracético (TFA). O solvente B foi água Milli Q com acetonitrila, na proporção 20:80 (v/v), contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA).

A coluna foi inicialmente equilibrada com a fase móvel contendo 80% (v/v) do solvente A e 20% (v/v) do solvente B. Após a injeção da amostra tratada, a fase móvel inicial (20% (v/v) de B) foi mantida por 3 minutos. Após foi iniciado um gradiente linear de 20 a 55% (v/v) de B, de 3 minutos até 25 minutos. A seguir um outro gradiente linear de 55 a 80% (v/v) de B, de 25 minutos a 28 minutos, e finalmente um gradiente linear de 80% (v/v) de B para 20% (v/v) de B, de 28 a 40 minutos. Esta última etapa reequilibra a coluna.

#### **4.9.3 – Determinação do Tempo de Retenção e curva de calibração do CMP**

##### **4.9.3.1- Em CLAE-FR/EM**

Para determinação do tempo de retenção do CMP por CLAE-FR/EM foi preparada uma solução do padrão de CMP (Arla foods) em água Milli-Q nas

concentrações de 30, 45, 60, 75 e 90 mg/L de CMP e o resultado foi comparado com o padrão preparado em leite UAT descongelado sem CMP nas mesmas concentrações.

O padrão em solução aquosa foi filtrado em filtro millipore 0,22 µm (MILEX), e injetado conforme condições cromatográficas e espectrometria de massa, descritas no item 4.9.2. A curva de calibração foi realizada em três repetições em duplicata.

A detecção do CMP<sub>A</sub> foi baseada no reconhecimento do íon de relação massa/carga 1697,4<sup>+4</sup> e 2263,3<sup>+3</sup> pelo monitoramento dos íons selecionados. O CMP<sub>A</sub> foi quantificado pela avaliação da intensidade do íon 1697,4<sup>+4</sup> m/z. Os espectros de massa foram determinados com base na medida das moléculas protonadas ([M<sup>+</sup> + nH]<sup>n+</sup>) com o software Analyst versão 1.4.2 da Applied Biosystems.

A precisão da massa na faixa m / z 1500-2500 foi garantida através de calibração com padrão de CMP (Arla foods) a 89,72% (m/v), (cerca de 100 ng /µL em Acetonitrila: água 1:1), infundido em separado.

Para calcular a concentração real CMP na amostra foi utilizada uma curva analítica a partir de uma solução padrão de CMP (Arla foods) a 89,72% (m/v). Foram adicionados volumes do CMP a 89,72% (m/v) em leite para obter os padrões nas concentrações de 30, 45, 60, 75 e 90 mg/L de CMP.

As amostras foram preparadas conforme metodologia descrita no item 4.8 e injetadas nas condições cromatográficas e espectrometria de massa descritas no item 4.9.2. A curva analítica foi feita com três repetições em duplicata.

#### **4.9.3.2- Em CLAE-FG**

Para calcular a concentração real CMP na amostra foi utilizada uma curva analítica a partir de uma solução padrão de CMP (Arla foods) a 89,72% (m/v). Foram adicionados volumes do CMP a 89,72% (m/v) em leite para obter os padrões nas concentrações de 30, 45, 60, 75 e 90 mg/L de CMP.

As amostras foram preparadas conforme metodologia descrita no item 4.8 e injetadas nas condições cromatográficas descritas no item 4.3. A curva analítica foi feita com três repetições em duplicata.

#### **4.10- Análise do leite cultivado com *Pseudomonas fluorescens* e adicionado de diferentes concentrações de soro de leite por CLAE-FR/EM**

Para detectar a relação massa/carga dos íons característicos do leite cultivado com bactérias psicotríficas, uma amostra de leite inoculada com *Pseudomonas fluorescens*,

incubada a 7 °C por 6 dias (preparada como descrito no item 4.6), e tratada como no item 4.8, foi analisada por CLAE-FR/EM.

O Full Scan da massa do espectro foi obtido realizando o scanning das razões massa/carga de 200-2500 m/z durante 40 minutos da corrida cromatográfica. Através do full scan foi verificado a presença de dois íons de relação massa/ carga de 1358,2<sup>+5</sup> e 1301,2<sup>+5</sup> m/z em maior intensidade e estes não eram visto com intensidade significativa no leite adicionado de padrão de CMP.

A detecção do pseudo CMP foi baseada no reconhecimento do íon de relação massa/carga 1358,2<sup>+5</sup> e 1301,2<sup>+5</sup> pelo monitoramento dos íons selecionados. A quantificação não foi realizada, por não haver um padrão de pseudo CMP. Os espectros de massa foram determinados com base na medida das moléculas protonadas ( $[M^+ + nH]^+$ ) com o software Analyst versão 1.4.2 Applied Biosystems.

#### **4.11 – Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System – SAS Intitute Inc., Cary, NC, USA), versão 9.1, licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

##### **4.11.1 – Efeito da adição de soro e tempo de incubação de uma cultura de *Pseudomonas fluorescens* nos métodos de detecção de CMP.**

No ensaio experimental do efeito da adição de soro após o período de incubação de *Pseudomonas fluorescens* na detecção de CMP nas amostras analisadas por CLAE-FR/EM e CLAE-FG foi montado um esquema fatorial (5x5x2) sendo 5 níveis de concentração de soro (0, 5, 10, 15 e 20% (v/v)), 5 níveis para tempo de incubação da cultura de *Pseudomonas fluorescens* (0, 2, 4, 6, e 8 dias) e 2 níveis para os métodos de análise da presença de CMP (CLAE-FR/EM e CLAE-FG). Os 50 tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições em duplicata, tendo como fonte de variação: método, soro, tempo, método x soro, método x tempo, soro x tempo, método x soro x tempo. Os resultados foram interpretados por meio de análise de variância, utilizando teste F ao nível de 5% de probabilidade.

**4.11.2 – Efeito da adição de soro e tempo de incubação de uma cultura de *Pseudomonas fluorescens* na detecção de CMP proveniente do soro de leite e pseudo CMP proveniente de proteases de *Pseudomonas fluorescens* por CLAE-FR/EM.**

Na análise de CMP proveniente do soro de leite e do pseudo CMP proveniente de proteases de *Pseudomonas fluorescens* por HPLC-RP, foi montado um experimento onde as amostras de leite foram tratadas com uma cultura de *Pseudomonas fluorescens* durante diferentes tempos de incubação e após adição de diferentes concentrações de soro. Um esquema fatorial (5x5), em delineamento inteiramente casualizado, foi instalado, sendo 5 níveis para tempo de incubação da cultura de *Pseudomonas fluorescens* (0, 2, 4, 6, e 8 dias) e 5 níveis de concentração de soro (0, 5, 10, 15 e 20% (v/v). Os 25 tratamentos, com 3 repetições em duplicata, tiveram como fonte de variação: tempo, soro, tempo x soro. Os resultados foram interpretados por meio de análise de variância, utilizando teste F ao nível de 5% de probabilidade.

## 5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Análises físico-químicas e microbiológicas do leite UAT isento de CMP.

Os resultados das análises físico-química e microbiológica do leite UAT comercial sem CMP coletado em uma indústria de laticínios, no mesmo dia de sua produção, e imediatamente congelado encontram-se no Quadro 2.

**Quadro 2** – Resultados das análises físico-química e microbiológica do leite UAT sem CMP

Análises	1° Repetição*	2° Repetição*	3° Repetição*
Matéria gorda (g/100g)	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,2
Densidade Relativa 15°C (g/mL)	1,030 ± 0,002	1,028 ± 0,001	1,030 ± 0,005
Acidez titulável, expressa em g de ácido láctico/100 mL de leite	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Índice Crioscópico °H	-0,530 ± 0,003	-0,530 ± 0,003	-0,530 ± 0,003
Estabilidade ao etanol 68% (v/v)	Estável	Estável	Estável
ESD (%) (m/m)	8,4 ± 0,05	8,4 ± 0,05	8,4 ± 0,05
Contagem Padrão em Placas (CPP), (UFC/mL)	1,0 X 10 <sup>1</sup> ± 0,001	1,0 X 10 <sup>1</sup> ± ,001	1,0 X 10 <sup>1</sup> ± 0,5
População de Bactérias Psicrotróficas em Placas (UFC/mL)	0	0	0

\* Média ± Desvio Padrão

Todos os resultados obtidos estavam dentro dos padrões fixados pela Portaria nº 370 (BRASIL,1997), indicando que o leite utilizado neste experimento estava em boas condições e apto para consumo.

## 5.2 – Análises microbiológicas do leite UAT cultivado com *Pseudomonas fluorescens*

O leite UAT sem CMP foi inoculado com *Pseudomonas fluorescens* obtendo uma população de  $10^3$  UFC/mL com 0 horas de incubação. Este leite foi incubado em uma estufa a  $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 2, 4, 6 e 8 dias e realizado a contagem de psicotróficos. Os resultados encontram-se no Quadro 3.

**Quadro 3** – Efeito do tempo de estocagem do leite UAT, inoculado com *Pseudomonas fluorescens* sobre o crescimento de microorganismos psicotróficos.

Tempo de incubação (dias)	Contagem (log UFC/mL)*
0	$3,30 \pm 0,5$
2	$4,22 \pm 1,0$
4	$6,12 \pm 0,5$
6	$7,12 \pm 0,5$
8	$7,22 \pm 0,5$

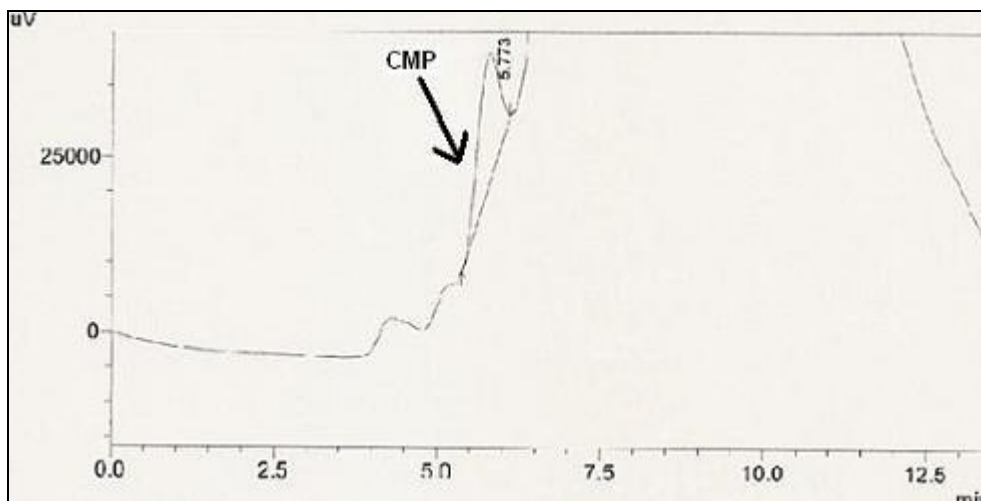
\* Média  $\pm$  Desvio Padrão

Observa-se que o tempo de estocagem a  $7\text{ °C}$  do leite UAT adicionado de *Pseudomonas fluorescens* é um fator determinante para a multiplicação destas bactérias.

Em seus estudos ALVIM(1992), observou o efeito do tempo e da temperatura de estocagem do leite esterilizado, inoculado com três estirpes de *Pseudomonas*, sobre o crescimento de microorganismos psicotróficos e observou que ocorrem um crescimento de microorganismos psicotróficos com o aumento do tempo de incubação. Segundo o autor, a atividade proteolítica foi intensa com o aumento do tempo de incubação, ocorrendo liberação de peptídeos em concentrações muito elevadas.

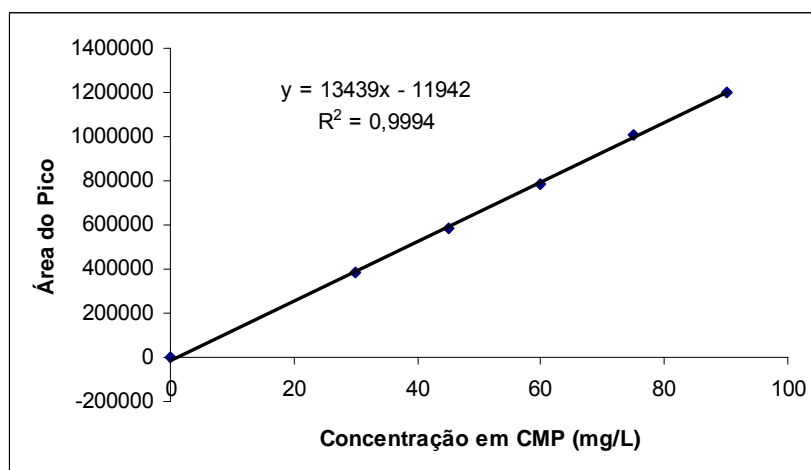
## 5.3 – Detecção do CMP por CLAE-FG

O tempo de retenção do CMP foi em torno de 5,7 minutos, o que pode ser observado na Figura 5, que ilustra o resultado da adição de 90 mg/L de padrão de CMP ao leite UAT. A produção do CMP foi notada pelo aumento do seu pico correspondente, não havendo modificações em outros picos. A alta absorvância, registrada no tempo de retenção de 7.6 minutos, é proveniente da detecção do TCA na amostra e de outros componentes do leite não analisados (ALVIM, 1992).



**Figura 5-** Cromatograma (CLAE-FG) do leite UAT adicionado de 90 mg/L do padrão de CMP

A curva analítica do CMP em Leite UAT apresentou coeficiente de regressão de 0,9994 (Figura 6).



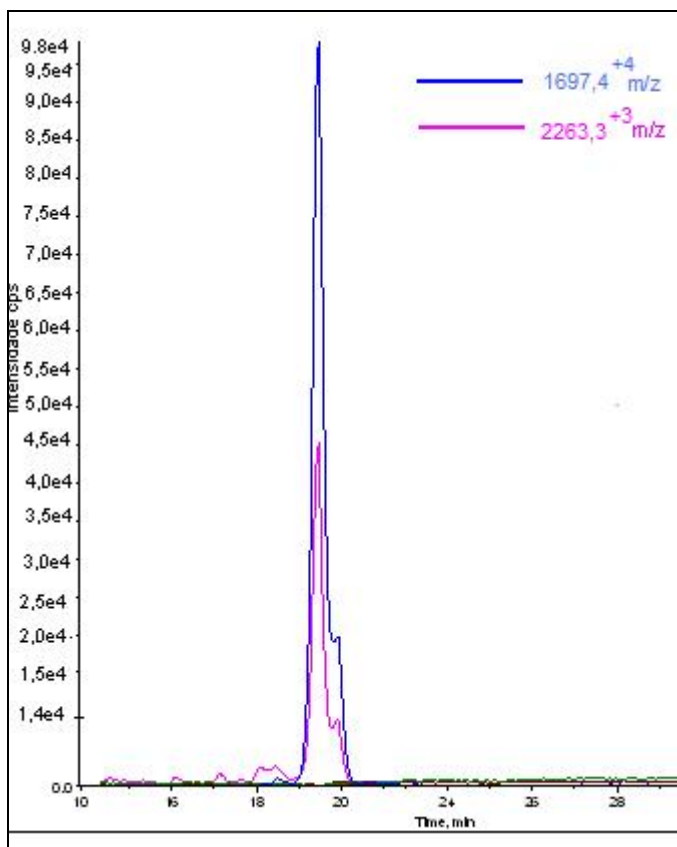
**Figura 6-** Curva analítica do padrão de CMP (0, 30, 45, 60, 75 e 90 mg/L) em leite analisado por CLAE-FG

#### 5.4 – Análise do padrão de CMP em água por CLAE-FR/EM

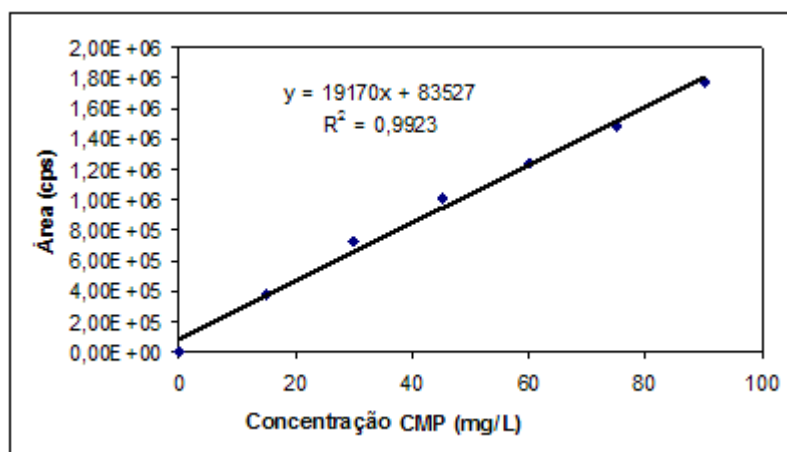
O cromatograma do padrão de CMP (Arla Foods) solubilizado em água, obtido da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa com detecção por Espectrometria de massa (CLAE-FR/EM), apresentou tempo de retenção, em torno de 19,7 minutos. Na Figura 7 pode-se observar a presença de dois íons com diferentes Massa/Carga ( $m/z$ ) nesse tempo de retenção, sendo o principal com  $m/z$  de 1697,4<sup>+</sup> e o

segundo com  $m/z$  de  $2263,3^{+3}$ . MOLLÉ e LÉONIL (2005) já haviam determinado que esses íons são característicos da análise de CMP, sendo, todos oriundos do  $CMP_A$  (CMP da variante genética A).

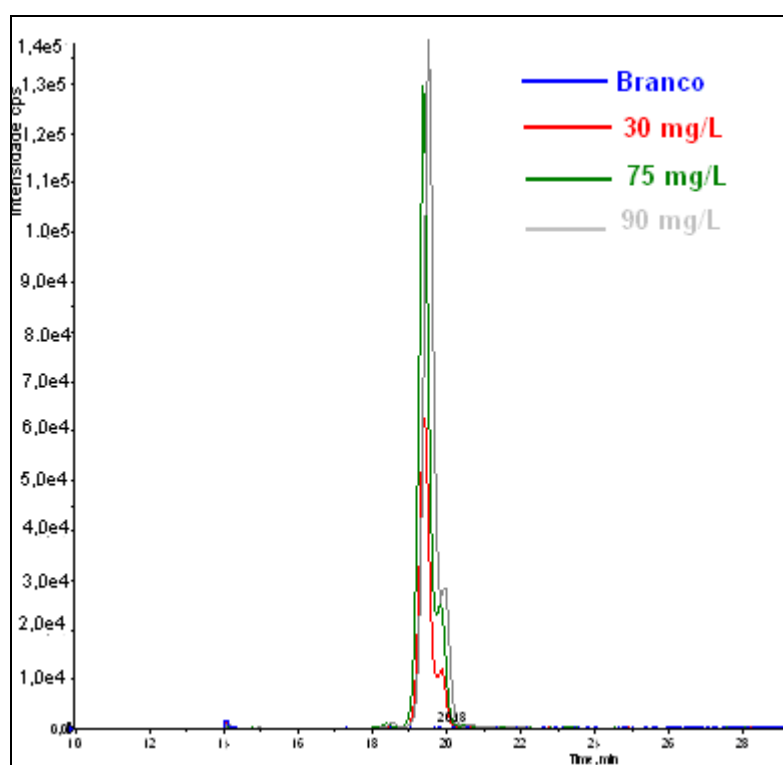
A curva analítica do íon de relação massa/carga  $1697,4^{+4}$ , variando de 0 mg/L até 90 mg/L, encontra-se na Figura 8, e apresentou coeficiente de correlação de 0,9923. A adição crescente do padrão de CMP somente aumentou as áreas dos picos no tempo de retenção de 19,7 minutos ( $1697,4^{+4}$ ), conforme pode ser observado no Figura 9.



**Figura 7-** Cromatograma dos íons monitorados obtido na análise do padrão de CMP em água (45 mg/L) por CLAE-FR/EM



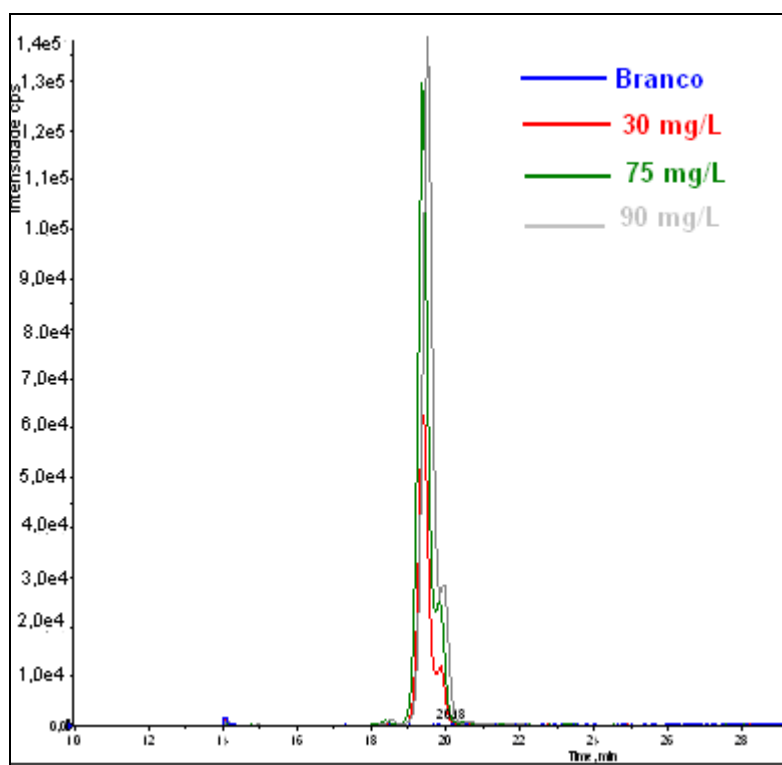
**Figura 8** – Curva analítica do CMP em água obtido pelo monitoramento do íon específico  $1697,4^{+4}$  m/z.



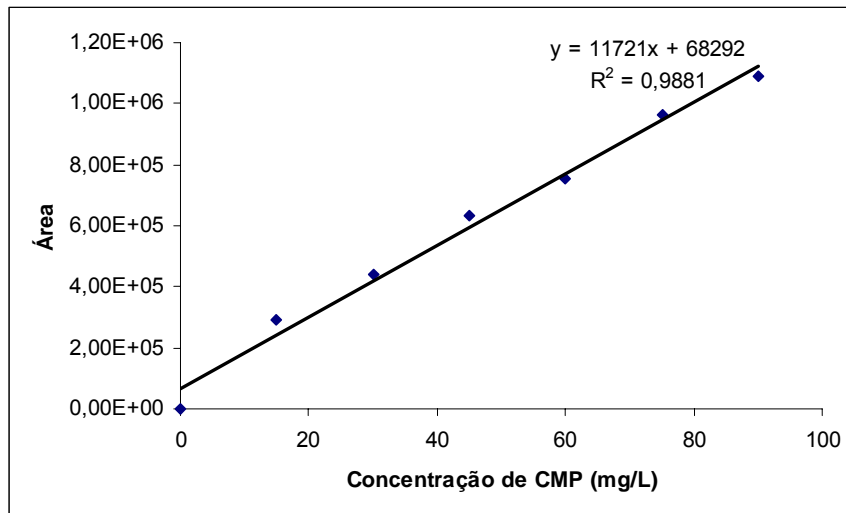
**Figura 9** – Cromatogramas do padrão de CMP em água nas concentrações de 0, 30, 75 e 90 mg/L, monitorados no íon de relação massa/carga de  $1697,4^{+4}$ , analisadas por CLAE-FR/EM

### 5.5 – Análise do padrão de CMP em leite por CLAE-FR/EM

O cromatograma do padrão de CMP em leite UAT sem CMP, em concentrações que variaram de 0 a 90 mg/L, monitorado para a massa/carga  $1697,4^{+4}$  m/z encontra-se na Figura 10. Observa-se que o monitoramento deste íon, no tempo de retenção 19,7 minutos, aumenta a sua área cromatográfica proporcionalmente ao aumento do padrão de CMP, demonstrando que a matriz (água ou leite) onde o padrão de CMP foi dissolvido não afetou o seu tempo de retenção. A curva analítica dos resultados obtidos na Figura 10 encontra-se na Figura 11, apresentando coeficiente de correlação de 0,9881.

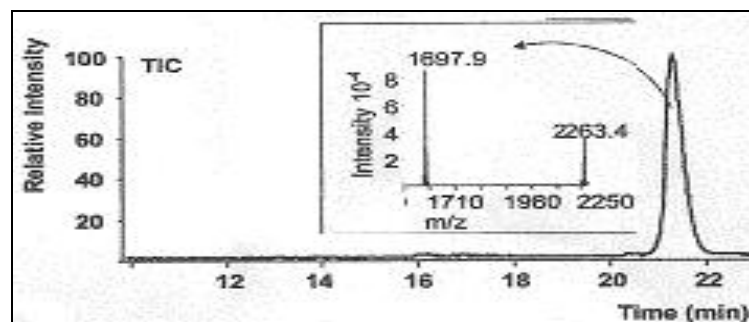


**Figura 10** – Cromatogramas do padrão de CMP em leite nas concentrações de 0, 30, 75 e 90 mg/L, monitorados no íon de relação massa/carga de  $1697,4^{+4}$ , analisadas por CLAE-FR/EM



**Figura 11** – Curva analítica do CMP em leite UAT sem CMP obtido pelo monitoramento do íon específico  $1697,4^{+4}$  m/z

Em seus estudos de determinação quantitativa de macropéptídeos da  $\kappa$ -caseína bovina em produtos lácteos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-espectrometria de massa de ionização por electrospray (CLAE-FR/EM), MOLLÉ e LEÓNIL (2005), também verificaram a presença dos íons específicos  $1698^{+4}$  e  $2264^{+3}$  m/z como forma de quantificação do Aglico-CMP<sub>A</sub>. E os mesmos foram observados no tempo de retenção em torno de 20 minutos (Figura 12).

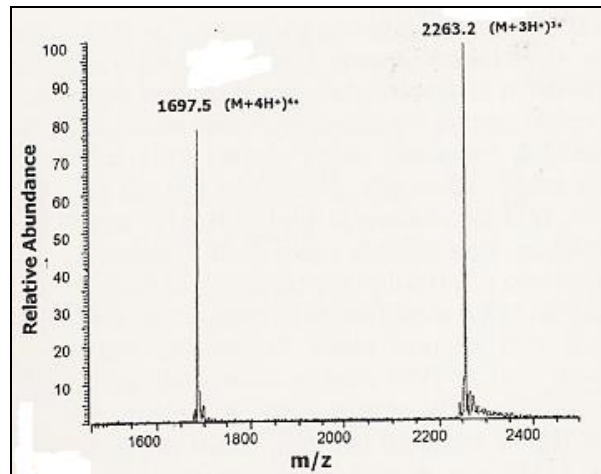


FONTE: MOLLÉ e LEÓNIL (2005)

**Figura 12-** Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-espectrometria de massa de ionização por electrospray do CMP (variante A) obtido pelo acompanhamento dos íons específico  $1698,4^{+4}$ ,  $2264,3^{+3}$  a partir de aglico-CMP<sub>A</sub>.

NONI e RESMINI (2005) em seus estudos de identificação da adição de soro de leite em pó em manteiga tradicional por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-espectrometria de massa de ionização por electrospray de aglico-CMP<sub>A</sub> monitoraram os

íons  $1697,5^{+4}$  e  $2263,2^{+3}$  m/z como indicativos da presença de  $CMP_A$  em suas amostras (Figura 13). Entretanto eles usaram outras condições para a separação cromatográfica, que causaram a eluição do CMP no tempo de retenção de 26,8 minutos.

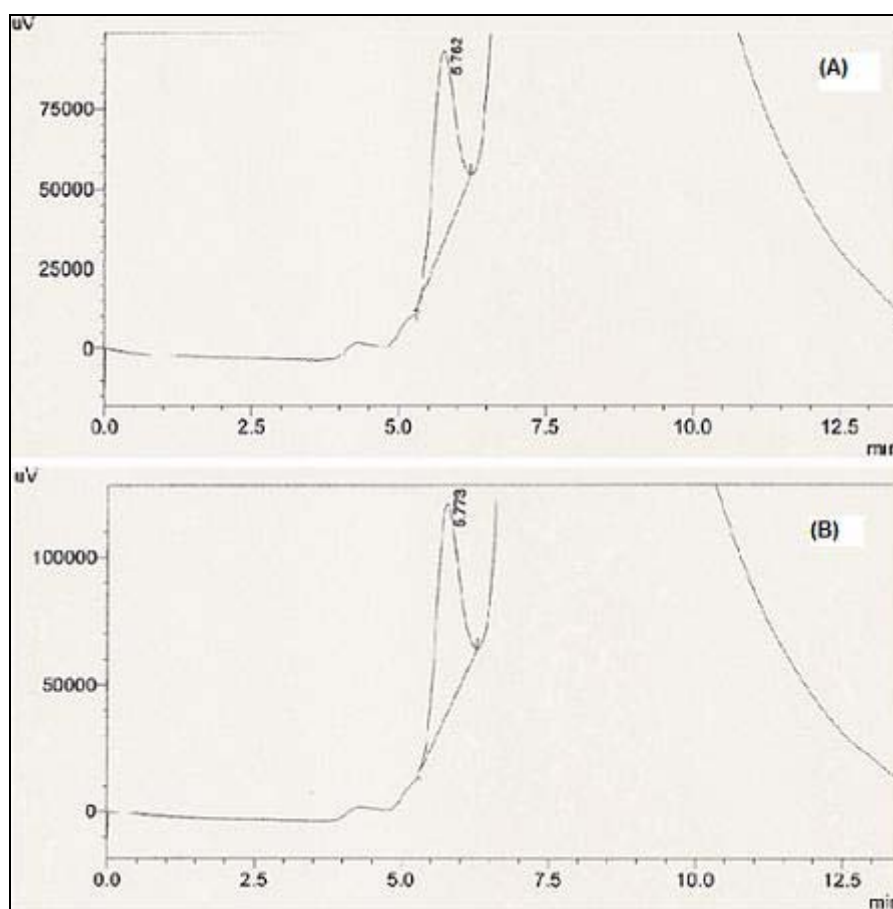


FONTE: NONI e RESMINI (2005)

**Figura 13-** Varredura de massa/carga do pico correspondente ao tempo de retenção de 26,8 minutos obtidos por análise de amostras de manteiga por CLAE/EM (NONI e RESMINI 2005).

### **5.6 – Aplicação de CLAE-FG para a detecção da presença de soro de leite adicionado ao leite UAT**

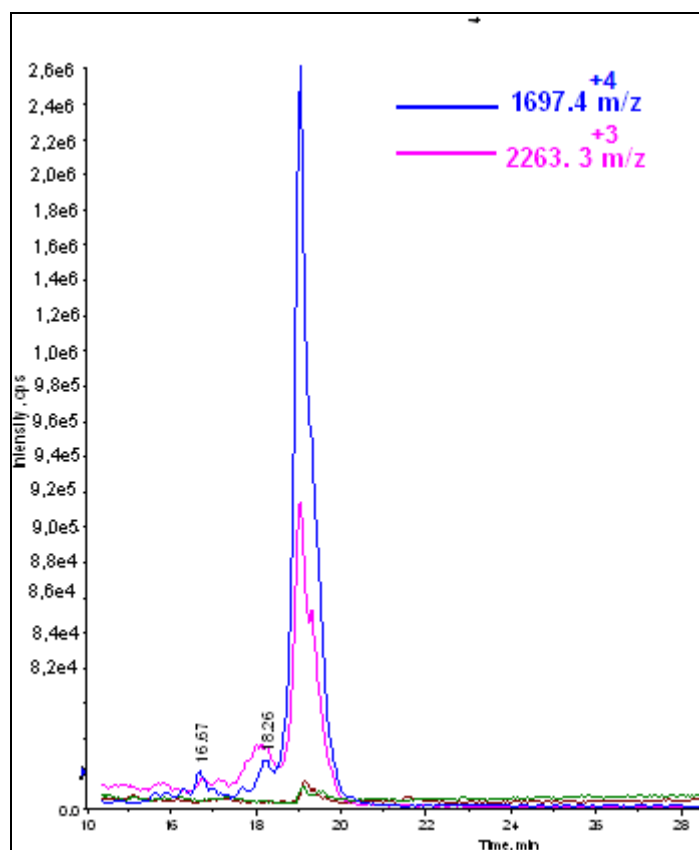
Os cromatogramas da Figura 14 representam a adição de 15 e 20% (v/v) de soro de leite ao leite UAT sem CMP, confirmando que a adição de soro de leite ao leite apresenta um pico cromatográfico com o mesmo tempo de retenção (5,7 minutos) do padrão do CMP quando adicionado ao leite. A medida que a concentração de soro de leite ao leite UAT foi aumentada, a área característica do pico do CMP também aumentou. Com isso, podemos perceber que a adição de soro de leite ao leite pode ser detectada pela análise do CMP por CLAE-FG. ALVIM (1992), observou em seus estudos que ao adicionar ao leite pasteurizado, soro de leite pasteurizado, houve aumento proporcional da área do pico do glicomacropéptido.



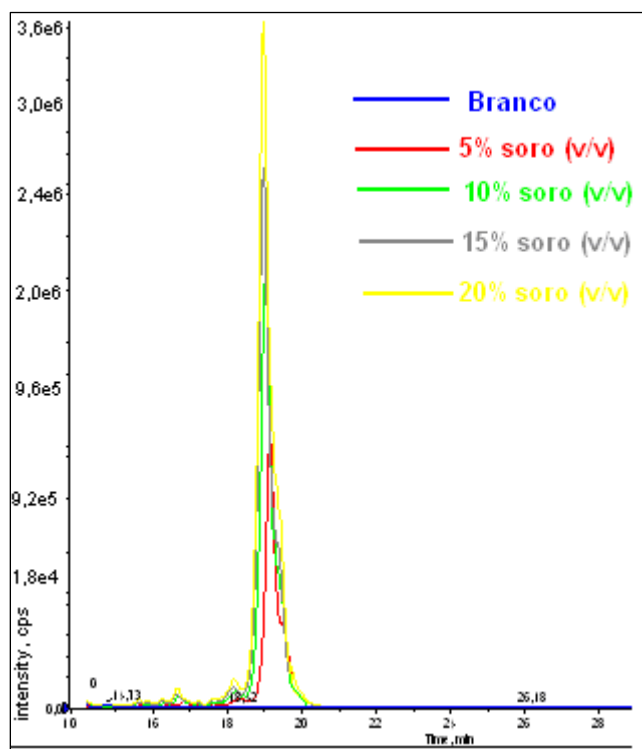
**Figura 14**-Cromatogramas (CLAE-FG) do leite UAT adicionado de 15 % (v/v) (A) e 20 % (v/v) (B) de soro de leite.

### 5.7 – Aplicação de CLAE-FR/EM para a detecção da presença de soro de leite adicionado ao leite UAT

Amostras de leite UAT sem CMP adicionada de soro de leite foram analisadas por CLAE-FR/EM. Foi verificado que o perfil cromatográfico (Figura 15) é igual ao do leite adicionado do padrão de CMP. A adição de soro de leite ao leite UAT foi quantificada através do monitoramento do íon de relação massa/carga  $1697.4^{+4}$ . Observou-se que o pico característico do CMP ( $1697.4^{+4}$ ), aumentou proporcionalmente com o aumento da adição de soro ao leite nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% (v/v) (Figura 16). Com isso, podemos concluir que a adição de soro de leite ao leite pode ser detectada pela análise do CMP ( $1697.4^{+4}$ ) por CLAE-FR/EM.



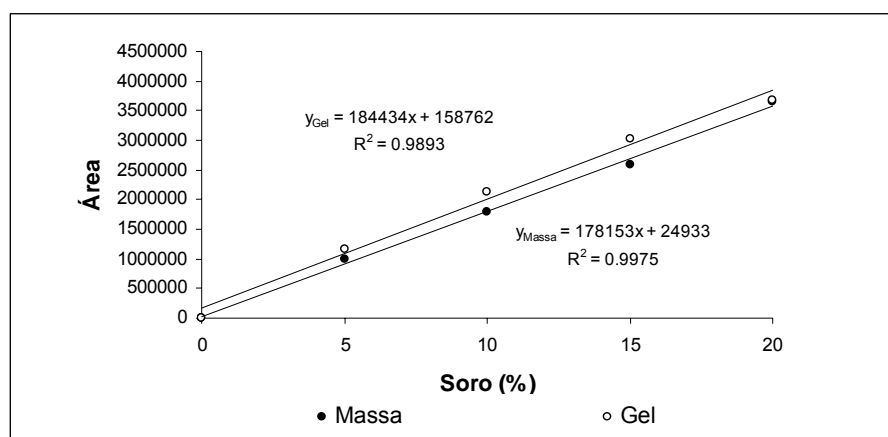
**Figura 15-** Cromatogramas da análise de leite UAT sem CMP adicionado de 15% (v/v) de soro de leite, monitorados no íon de relação massa/carga de  $1697,4^{+4}$  e  $2263,3^{+3}$  m/z analisadas por CLAE-FR/EM.



**Figura 16** – Cromatogramas do padrão de CMP em leite UAT sem CMP adicionada de soro de leite nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% (v/v), monitorado no íon com relação massa/carga de  $1697,4^{+4}$ , analisadas por CLAE-FR/EM.

### **5.8 – Análise do leite UAT sem CMP adicionado de diferentes concentrações de soro de leite por CLAE-FG e CLAE-FR/EM**

Os resultados das análises do leite UAT isento de CMP, analisado por CLAE-FG e CLAE-FR/EM encontram-se na Figura 17. Nela pode-se observar houve aumento da área do pico relativo ao CMP em função do aumento da concentração de soro de leite na amostra.



**Figura 17-** Variação da área de detecção de CMP em função de diferentes concentrações de soro de leite utilizando como método de análise CLAE-FG e CLAE-FR/EM

O Quadro 4 mostra o resumo da análise de variância de dois métodos (CLAE-FG e CLAR-FR/EM) utilizados na detecção de CMP em amostras de leite adicionados com diferentes concentrações de soro.

**Quadro 4** – Resumo da análise de variância de dois métodos utilizados na detecção de CMP em amostras de leite adulterados com diferentes concentrações de soro de leite

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Método	1	2900E8*
Concentração de soro	4	1,2358E13*
Método*soro	4	2214E8*
Resíduo	20	6541E6

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Existe diferença significativa entre os métodos de análise ( $p < 0,05$ ) por CLAE-FG e CLAR-FR/EM. O efeito da concentração de soro de leite foi significativo na análise das amostras pelos dois métodos ( $p < 0,05$ ), o aumento da concentração de soro acarreta um aumento da área correspondente ao CMP pelos dois métodos.

### 5.9 – Análise do leite UAT sem CMP cultivado com *Pseudomonas fluorescens*, adicionado de soro de leite por CLAE-FG

O Quadro 5 mostra o resumo da análise de variância na detecção de CMP por CLAE-FG em amostras de leite adulteradas com diferentes concentrações de soro de leite cultivados com *Pseudomonas fluorescens* com diferentes tempo de incubação.

**Quadro 5-** Resumo da análise de variância na detecção de CMP por CLAE-FG em amostras de leite adulterados com diferentes concentrações de soro de leite cultivados com *Pseudomonas fluorescens* com diferentes tempos de incubação.

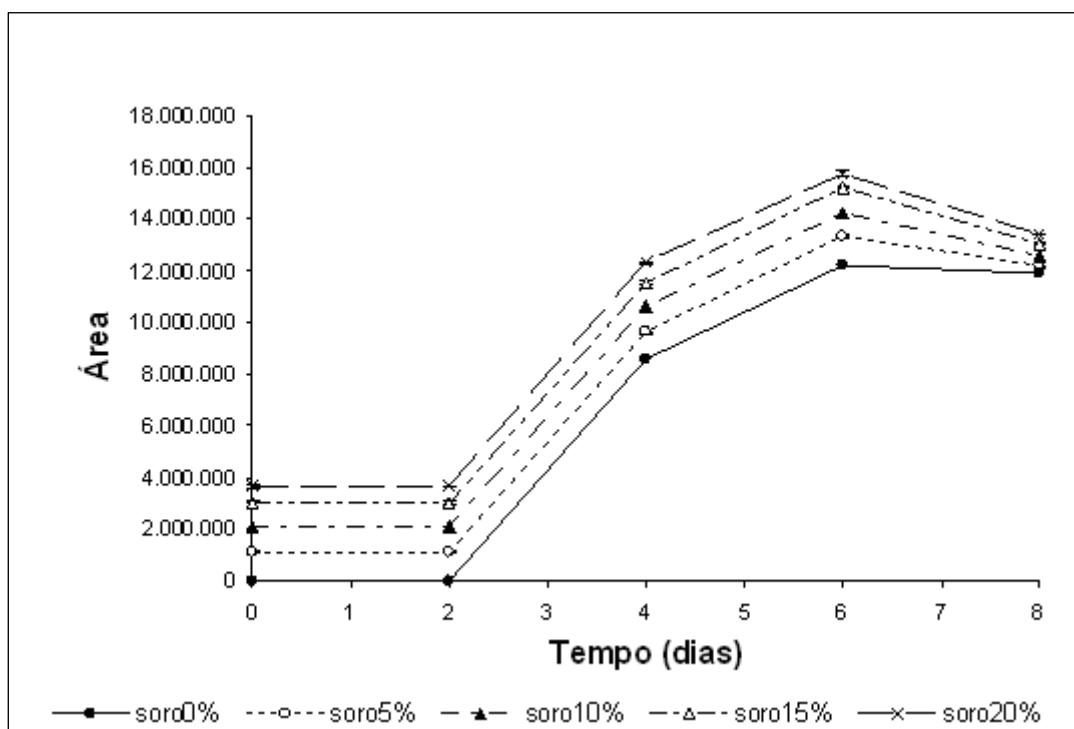
Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Soro	4	2,5089E13*
Tempo de incubação	4	5,1509E14*
Soro*Tempo de incubação	16	4,3018E11*
Resíduo	50	2,4753E9

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Quando ao leite foram adicionadas diferentes concentrações de soro de leite, observou-se que houve aumento da área do pico característico do CMP ( $p < 0,05$ ), a medida que foi aumentada a concentração de soro na amostra. O aumento do tempo de incubação das amostras de leite foi significativo no resultado das amostras ( $p < 0,05$ ).

Os resultados das análises do leite UAT isento de CMP, descongelado, inoculado com  $10^3$  UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens*, incubado em estufa a  $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, adicionado de 0; 5; 10; 15 e 20% (v/v) de soro de leite e analisado por CLAE-FG encontram-se na Figura 18. Nela pode-se observar que não houve aumento da área do pico relativo ao CMP em função do tempo de incubação até dois dias de incubação. No período entre dois dias e quatro dias de incubação pode-se observar um aumento rápido da área do pico relativo ao CMP. O aumento da área relativa ao CMP continuou aumentando até os 6 dias de incubação, porém com menor intensidade. Após 6 dias de incubação a área relativa ao pico do CMP tendeu a decrescer, possivelmente devido à extensa proteólise que estava ocorrendo.

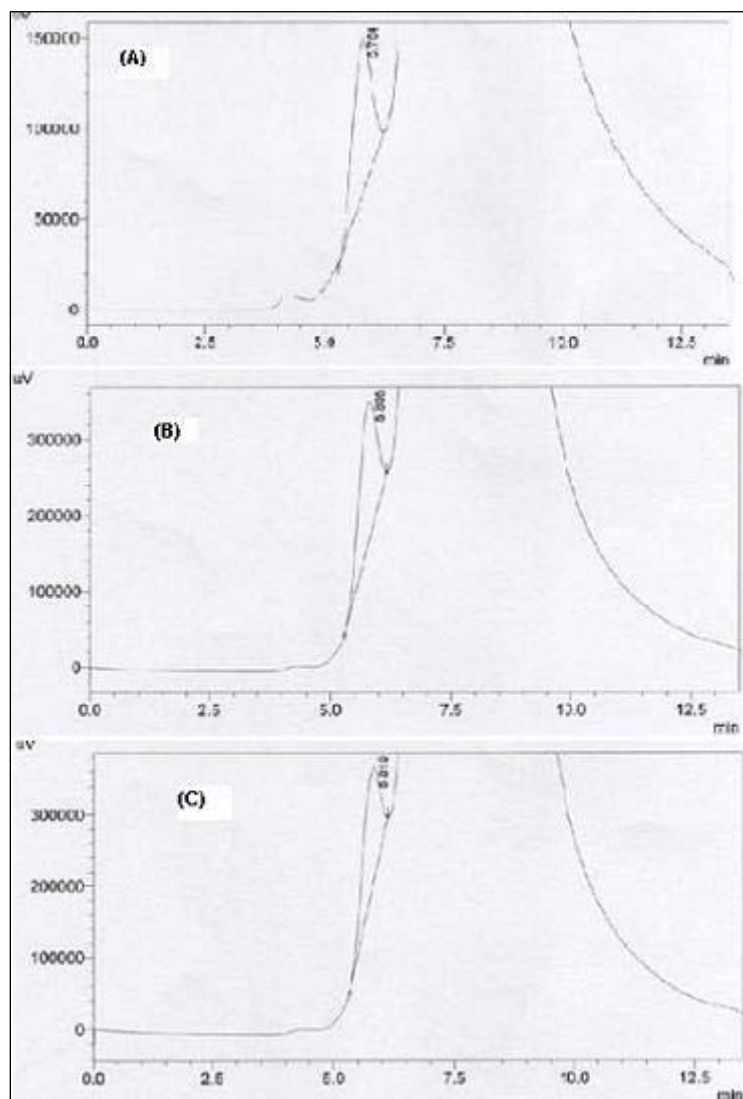
Quando analisado por outros métodos, pode-se observar que o leite incubado por 6 dias já se apresentava alterado, com viscosidade já muito aumentada, indicando que a proteólise já havia alterado completamente a sua qualidade. ALVIM (1992) já havia determinado que o leite incubado a  $7\text{ °C}$  por 6 dias já apresentava reação de coagulação ao alizarol 72%, e já apresentava com odor pútrido. ALVIM (1992) destacou também que a extensa taxa de proteólise observada pode ser devida à falta de competição do substrato por outras bactérias, o que não ocorre em leite cru comercial.



**Figura 18-**Variação da área de detecção de CMP em função do tempo de incubação de uma cultura psicotrófica na presença de diferentes concentrações de soro de leite utilizando como método de análise CLAE-FG.

O leite após ser incubado por quatro dias a 7°C, ele apresentou aumento da área relativa ao CMP. Observa-se, portanto, que a concentração de CMP no leite é um excelente indicador de sua qualidade, pois pode determinar a extensão de sua proteólise. A IN 69 determina que a concentração máxima de CMP no leite deve ser de 30 mg/L.

Na Figura 19 pode-se observar que houve indicação de presença de CMP no leite, a partir de 4 dias de incubação a 7 °C. A ocorrência deste resultado, registrado como um pico no mesmo tempo de retenção do CMP, foi devido à atuação de proteases produzidas por bactérias psicotróficas, sobre as caseínas do leite, liberando peptídeos que eram separados no mesmo tempo de retenção do CMP (OLIEMAN e Van RIEL, 1989).



**Figura 19-** Cromatogramas, por CLAE-FG, do leite UAT cultivado com *Pseudomonas fluorescens* e incubado a 7 °C por 4 dias (A) e 6 dias (B) e 8 dias (C).

O Quadro 6 mostra a área do pico do CMP obtida pela análise do leite cultivado com *Pseudomonas fluorescens* e incubado por 0, 2, 4, 6, e 8 dias a 7 °C, sem adição de soro de leite, e o valor correspondente da concentração CMP (mg/L). A concentração do CMP em mg/L foi obtida através da equação de regressão linear ( $Y = 13439 X - 11942$ ).

**Quadro 6**-Valores médios das áreas de pico do CMP e sua concentração (mg/L), obtido pela análise das amostras de leite cultivado com *Pseudomonas fluorescens* em função do tempo de incubação por CLAE-FG

Tempo de incubação	Área	Concentração de CMP (mg/L)
0	0	0
2	0	0
4	8594363,3	638,62
6	12231485,7	909,26
8	11865335	882,01

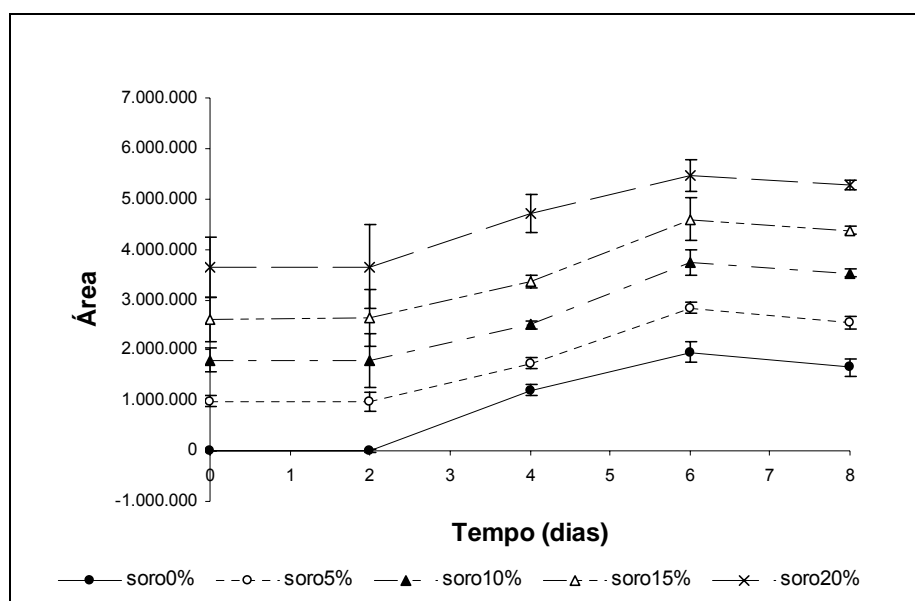
A concentração de CMP no leite sem adição de soro com 0 e 2 dias de incubação foi de 0, não detectando assim presença de CMP ou pseudo-CMP na amostra. O leite com 4, 6 e 8 dias de incubação apresentou concentração de 638,62, 909,26 e 882,01 mg/L (m/v) de CMP, não proveniente da adição de soro de leite ao leite UAT. A técnica de CLAE-FG, não diferencia o CMP proveniente do soro de leite, do CMP e/ou pseudo-CMP produzido por proteases de *P. fluorescens*. A extensa proteólise observada foi suficiente para que o leite apresentasse alteração na sua viscosidade após 6 dias de incubação

Esses resultados demonstram a importância das condições de estocagem do leite cru exigidas pela IN 51/2002, que é de no máximo 4 °C por no máximo 48 horas. Leite em temperatura mais elevada, ou estocado por tempo maior, e com presença de bactérias psicrotróficas, apresenta proteólise elevada, caracterizado pela presença de CMP. Leite de boa qualidade, propriamente conservado, tem concentração de CMP igual a 0 mg/L. Dessa forma, o resultado do Índice de CMP, como previsto na IN 69/2006, é um excelente indicador da intensidade de proteólise das proteínas do leite, ou então da adição fraudulenta do leite com soro de leite.

#### **5.10 – Análise do leite UAT sem CMP, cultivado com *Pseudomonas fluorescens* adicionado de soro de leite por CLAE-FR/EM**

Os resultados das análises por CLAE-FR/EM de leite UAT isento de CMP, adicionado de *Pseudomonas fluorescens* com população inicial de 10<sup>3</sup> UFC/mL, incubado a 7 °C ± 1 °C, por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, e após incubação adicionado de 0; 5; 10;

15 e 20% (v/v) de soro de leite, encontram-se na Figura 20. Nesta Figura pode-se observar que o íon com massa/carga de  $1697,4^{+4}$ , correspondente ao CMP verdadeiro, produzido pelo coalho durante a produção de queijo, e presente no soro de leite, também aumentou durante a proteólise que ocorreu durante a incubação do leite UAT sem CMP inoculado com *P. fluorescens*, inclusive quando adicionado de soro de leite. Estes resultados demonstram que a *P. fluorescens* também produz o CMP verdadeiro, obtido pela hidrólise enzimática da  $\kappa$ -caseína entre os aminoácidos 105-106, como ocorre com a ação enzimática da renina na produção de queijo.

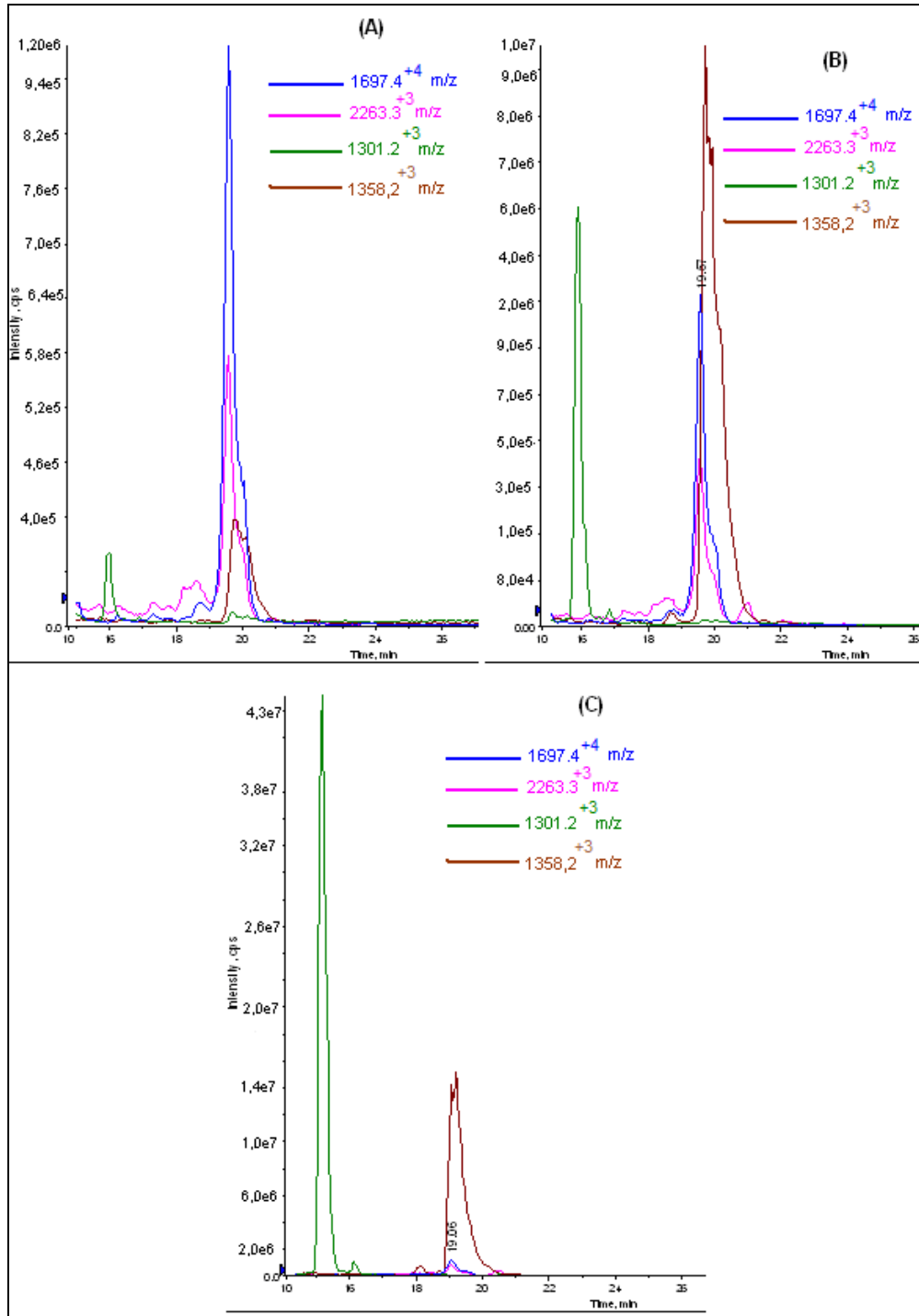


**Figura 20** - Resultados das análises do CMP verdadeiro (íon  $1697,4^{+4}$  m/z) por CLAE-FR/EM em leite UAT sem CMP, inoculado com *P. fluorescens*, incubado por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, e adicionado de diferentes concentrações de soro (0, 5, 10, 15 e 20% (v/v)).

Ao leite adicionado de *Pseudomonas fluorescens* com 0 e 2 dias de incubação foi observado que houve aumento da área de detecção do CMP quando adicionado ao leite, soro de leite nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% (v/v). Quando ao leite não foi adicionado soro de leite a área de detecção do CMP foi igual à zero, mostrando que não ocorre produção de CMP nem pseudo-CMP pelas proteases de bactérias psicotróficas.

Entretanto, a Figura 21 mostra os resultados das análises por CLAE-FR/EM de outros íons massa/carga, como o  $2263,3^{+3}$ , o  $1358^{+5}$ , e o  $1301,2^{+5}$ , além do  $1697,4^{+4}$ . Nesta Figura pode-se observar que a proteólise por *P. fluorescens*, além de produzir o íon carga/massa  $1697,4^{+4}$  também produziu os outros íons, inclusive em quantidades muito maiores do que o primeiro, quando a incubação ocorreu por tempo mais

prolongado. Estes outros íons provavelmente são oriundos da hidrólise de outras ligações peptídicas na  $\kappa$ -caseína, inclusive nas ligações entre os aminoácidos 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108 (RECIO et.al., 2000).



**Figura 21-** Cromatogramas obtidos por monitoramento dos íons específicos 1697,4<sup>+4</sup>, 2263,3<sup>+3</sup>, 1358<sup>+5</sup>, 1301,2<sup>+5</sup>, característico do leite cultivado com *Pseudomonas fluorescens* e incubado por 4 dias (A), 6 dias (B) e 8 dias (C).

Deve-se destacar, entretanto, que o tempo de retenção na análise por CLAE-FR/EM foi diferente para o íon com relação carga/massa  $1301,2^{+5}$ . O leite com 4, 6, e 8 dias de incubação com *P. fluorescens*, sem adição de soro de leite, apresentou a presença de dois picos, além dos dois característicos do CMP ( $1697,4^{+4}$  e  $2263,3^{+3}$ ), um outro com a relação massa carga  $1301,2^{+5}$ , no tempo de retenção em torno de 16 minutos e outro no mesmo tempo de retenção do CMP, em torno de 20 minutos, com relação massa carga  $1358^{+5}$ . Os íons  $1301,2^{+5}$  m/z e  $1358^{+5}$  m/z foram, conforme determinado nesse trabalho, característicos do leite cultivado com *P. fluorescens* com população acima de  $10^6$  UFC/mL, sendo, então, característico do hidrólise da caseína por proteases da *P. fluorescens*. De acordo com MITCHELL e EWINGS (1985), as proteases são capazes de hidrolisar toda a caseína disponível no leite em peptídeos solúveis. Com o aumento do tempo de incubação das amostras de leite, ocorreu aumento das áreas correspondentes aos íons  $1301,2^{+5}$  m/z e  $1358^{+5}$  m/z.

O Quadro 7 mostra o valor da concentração do CMP (íon  $1697,4^{+4}$  m/z) obtido no leite com *Pseudomonas fluorescens*, em diferentes tempos de incubação a 7° C em diferentes concentrações de soro de leite (0, 5, 10, 15 e 20% (v/v)). A concentração do CMP em mg/L foi obtida através da equação de regressão linear ( $Y = 11721 X - 68292$ ).

**Quadro 7**-Valor da concentração (mg/L) do CMP, obtido pela análise do leite sem cultivo e cultivado com *Pseudomonas fluorescens*, em diferentes tempo de incubação e concentrações de soro de leite por CLAE-FR/EM

Tempo (dias)	Concentração de CMP (mg/L)				
	0% soro	5% soro	10% soro	15% soro	20% soro
sem incubação	0	76,9	151,7	228,6	300,4
0	0	78,3	147,4	215,7	305,5
2	0	76,9	146,6	219,4	305,6
4	97,1	142,6	207,4	280,9	380,6
6	161,4	236,1	312,9	386,3	460,0
8	135,5	211,4	295,0	368,1	444,9

O leite UAT sem CMP e não cultivado, quando adicionado de soro de leite nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% (v/v), apresentou concentração de 0, 76,9; 151,7; 228,6 e 300,4 mg/L de CMP.

As diferentes concentrações de soro (0, 5, 10, 15 e 20% (v/v)) foram adicionados ao leite após a proteólise com o objetivo de verificar a possibilidade de quantificação de soro ao leite na presença de proteólise. No Quadro 7, pode-se observar que a medida que aumenta a concentração de soro ao leite sem incubação e incubado por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, ocorre um aumento na concentração de CMP na amostra.

A concentração de CMP no leite sem adição de soro com 0 e 2 dias de incubação foi de 0 mg/L, não detectando assim presença de CMP, no leite onde a população de *P. fluorescens* é menor ou igual a  $10^4$  UFC/mL. Quando adicionado ao leite, incubado por 0 e 2 dias, soro de leite nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% (v/v), estes apresentaram concentração de CMP proporcionais ao do leite sem cultivo e adicionado de soro de leite, nas mesmas concentrações.

O leite com 4, 6 e 8 dias de incubação apresentou concentração de 97,1; 161,4 e 135,5 mg/L de CMP, respectivamente, não proveniente da adição de soro de leite ao leite UAT. Quando ao leite incubado por 4, 6 e 8 dias foram adicionados diferentes concentrações de soro de leite (5, 10, 15 e 20% (v/v), a concentração de CMP nestas amostras aumentou proporcionalmente à concentração de soro adicionado.

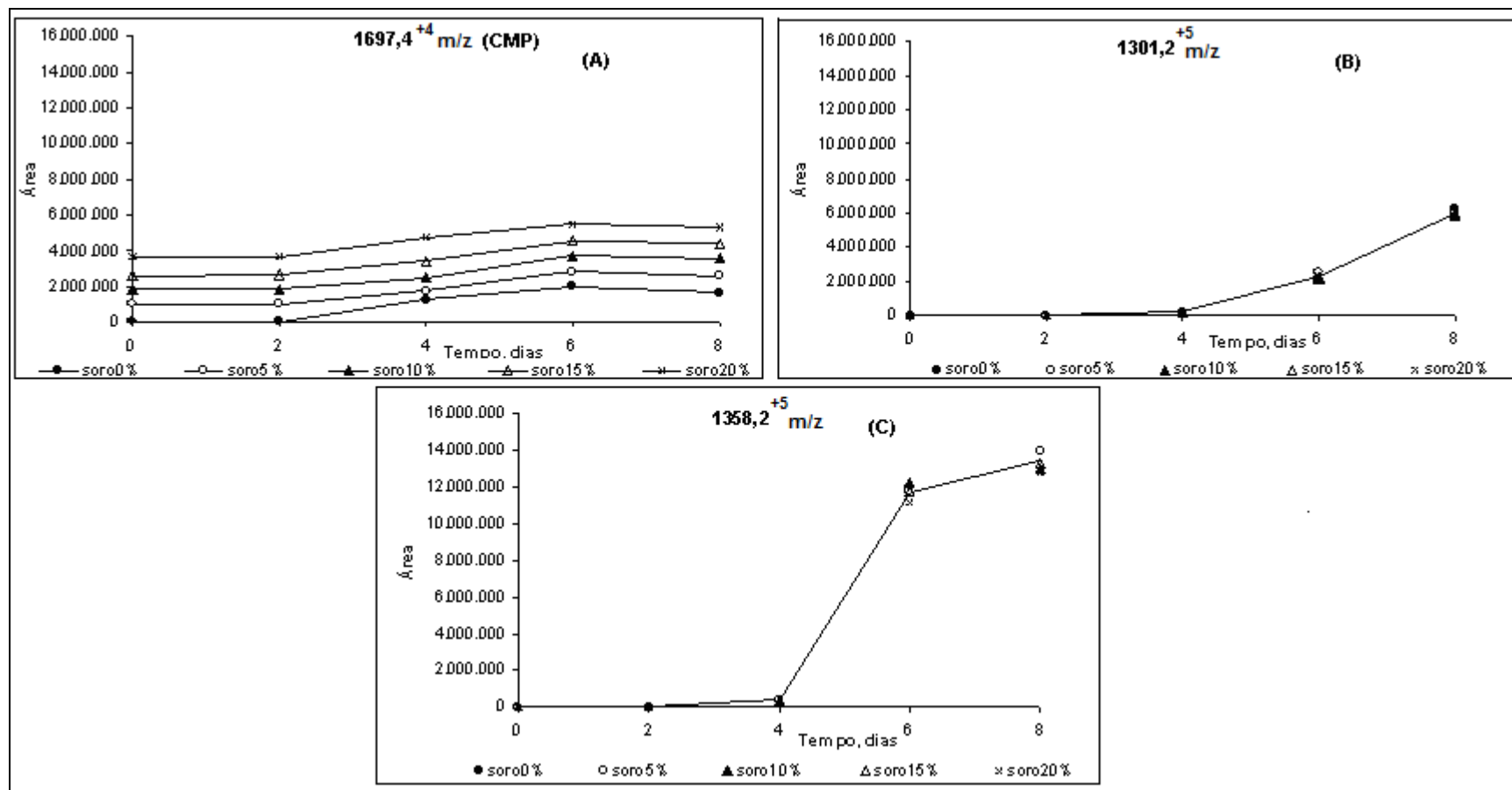
#### **5.11– Variação da concentração dos íons de relação massa/carga $1697,4^{+4}$ , $1301,2^{+5}$ e $1358,2^{+5}$ nas amostras de leite UAT sem CMP, cultivado com *Pseudomonas fluorescens* adicionado de soro de leite, determinado por CLAE-FR/EM.**

A Figura 22 mostra a variação da área de detecção do CMP ( $1697,4^{+4}$ ) (A), e dos íons de relação massa/carga  $1301,2^{+5}$  (B) e  $1358,2^{+5}$  (C) em função do tempo de incubação do leite UAT sem CMP com população inicial de  $10^3$  UFC/ml de *Pseudomonas fluorescens*, na presença de diferentes concentrações de soro utilizando CLAE-FR/EM como método de análise. Pode-se observar que o íon com massa/carga  $1697,4^{+4}$  (Figura 22 (A)) apresentou aumento de sua concentração durante o tempo de incubação até o sexto dia, para todas as concentrações de soro adicionadas (0% até 20%). Entretanto, após o sexto dia de incubação a concentração do íon massa/carga ( $1697,4^{+4}$ ) (Figura 22 (A)) apresentou redução na sua concentração, também para todas as concentrações de soro adicionado, provavelmente devido à extensa proteólise que

ocorreu no leite. Nesse caso a proteólise foi tão extensa que o próprio CMP foi também, parcialmente, hidrolisado. No sexto dia de incubação o leite já apresentava viscosidade alterada, e no oitavo dia já estava coagulado.

Por outro lado, os íons com massa/carga  $1301,2^{+5}$  e  $1358,2^{+5}$  não aumentaram suas concentrações, quando ao leite foram adicionadas diferentes concentrações de soro, a concentração destes íons, independe da concentração de soro adicionada ao leite.

O aumento da área do íon carga/massa  $1358,2^{+5}$  (Figura 22 (C)) começou a ocorrer após o segundo dia de incubação, e foi acelerando até o oitavo dia. Já a área do íon com carga/massa  $1301,2^{+5}$  (Figura 22 (B)) também começou a aumentar a sua área após o segundo dia de incubação, mas teve o aumento de área mais pronunciado após o quarto dia de incubação. Esses resultados demonstram que o leite não deve ser conservado por mais de dois dias a esta temperatura, pois o leite já começa a ser proteolísado, mesmo quando a contaminação inicial por *P. fluorescens* for de  $10^3$  UFC/ml.



**Figura 22-**Varição da área dos íons (1697,4<sup>+4</sup> m/z)(A), 1301,2<sup>+5</sup> (B) e 1358,2<sup>+5</sup> (C) em função do tempo de incubação de amostras de leite UAT sem CMP, inoculado com *P. Fluorescens*, população inicial de 10<sup>3</sup> UFC/ml, e posteriormente adicionado de diferentes concentrações de soro de leite analisada por CLAE-FR/EM.

O Quadro 8 mostra o resumo da análise de variância na detecção de CMP (1697,4<sup>+4</sup>) e dos íons de relação massa 1301,2<sup>+5</sup> e 1358,2<sup>+5</sup> em amostras de leite adicionadas de diferentes concentrações de soro após o período de incubação com *Pseudomonas fluorescens* por CLAE-FR/EM.

**Quadro 8** - Resumo da análise de variância na detecção de CMP (1697,4<sup>+4</sup>) e dos íons de relação massa 1301,2<sup>+5</sup> e 1358,2<sup>+5</sup> em amostras de leite adicionadas de diferentes concentrações de soro após o período de incubação com *Pseudomonas fluorescens* por CLAE-FR/EM

Fonte de variação	g.l	Quadro médio		
		1358,2 <sup>+5</sup>	1301,2 <sup>+5</sup>	CMP(1697,4 <sup>+4</sup> )
Tempo	4	7,0215E14*	1,0070E14*	1,9440E13*
Soro	4	3,5578E11 <sup>n.s</sup>	2,0013E10 <sup>n.s</sup>	2,1212E13*
Soro*tempo	16	2,4333E11 <sup>n.s</sup>	2,3622E10 <sup>n.s</sup>	9,6917E11 <sup>n.s</sup>
Resíduo	50	6,4436E11	1,0533E11	8,0285E11

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>n.s</sup> - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

No Quadro8, percebe-se que o tempo de incubação (0, 2, 4, 6 e 8 dias), é significativo ( $p < 0,05$ ) na detecção dos íons de relação massa/carga, 1358,2<sup>+5</sup>, 1301,2<sup>+5</sup> e CMP(1697,4<sup>+4</sup>). Sendo assim, o tempo de estocagem das amostras de leite cultivadas com *Pseudomonas fluorescens* é um fator determinante na detecção do CMP, e dos íons 1301,2<sup>+5</sup> e 1358,2<sup>+5</sup>. A medida que houve aumento no tempo de incubação ocorre um aumento da área do pico correspondente do CMP e dos íons 1301,2<sup>+5</sup> e 1358,2<sup>+5</sup> (Figura 22). Este aumento da área ocorre após o tempo de 2 dias de incubação. Com estes dados podemos concluir que este aumento da área é devido à atuação das proteases de bactérias psicrotróficas sobre a caseína.

O aumento da concentração de soro (0% até 20% de adição) não causou aumento da área de resposta dos íons de relação massa/carga 1358,2<sup>+5</sup> e 1301,2<sup>+5</sup> ( $p > 0,05$ ). Porém, a concentração de soro aumentou ( $p < 0,05$ ) a área do CMP (1697,4<sup>+4</sup>), em função do tempo de incubação da cultura de *Pseudomonas Fluorescens*.

## 6- CONCLUSÃO

A análise por CLAE-FG e por CLAE-FR/EM do leite UAT sem CMP, sem adição de *P. fluorescens*, sem incubação, ou então incubado por até 2 dias, adicionado de concentrações crescentes de soro de leite (de 0% a até 20%) demonstrou que somente o pico correspondente ao CMP verdadeiro (1697,4<sup>+4</sup>) aumentou. Isso demonstra que a adição de soro de leite ao leite UAT não cultivado por *P. fluorescens* pode ser detectada pela análise do CMP por estes dois métodos de análise.

Ao leite adicionado de *Pseudomonas fluorescens* com 0 e 2 dias de incubação, sem soro de leite a área de detecção do CMP foi igual à zero, mostrando que quando a contagem de psicotróficos no leite for menor do que 10<sup>6</sup> UFC/mL, não ocorre produção de CMP, e nem de pseudo-CMP (massa/carga de 1358,2) pelas proteases de bactérias psicotróficas.

Entretanto, o leite adicionado de *Pseudomonas fluorescens*, e incubado por 4, 6 e 8 dias a 7°C, e sem adição de soro de leite, apresentou aumento do pico no tempo de retenção característico do CMP, não proveniente da adição de soro de leite ao leite UAT, pelos dois métodos de análise. Dessa forma, o método de análise por CLAE-FG não diferenciou o CMP proveniente do soro de leite, do CMP e/ou do pseudo-CMP produzido por proteases de *P. fluorescens*.

O leite UAT sem CMP, sem adição de soro de leite, adicionado de *Pseudomonas fluorescens*, incubado por 4, 6 e 8 dias a 7°C, e analisado por CLAE-FR/EM, apresentou a presença do íon de relação massa/carga característico do CMP verdadeiro (1697,4<sup>+4</sup>) e mais dois outros íons, um no mesmo tempo de retenção do CMP, com massa/carga 1358,2<sup>+5</sup>, e outro, com massa/carga de 1301,2, no tempo de retenção de 16 minutos. Os íons 1301,2<sup>+5</sup> m/z (com tempo de retenção por CLAE-FR/EM de 16 minutos) e 1358<sup>+5</sup> m/z (com tempo de retenção de 20 minutos, igual ao tempo de retenção do CMP verdadeiro) foram, conforme determinado nesse trabalho, característicos do leite cultivado com *P. fluorescens* com população acima de 10<sup>6</sup> UFC/mL, sendo, então, característico da hidrólise da caseína por proteases da *P. fluorescens*.

O aumento do tempo de incubação do leite UAT sem CMP de 4 dias para 6 dias, quando a contagem de bactérias psicotróficas passou de 10<sup>6</sup> para 10<sup>7</sup> UFC/mL, o íon com

massa/carga de 1697,4<sup>+4</sup>, correspondente ao CMP verdadeiro, produzido pelo coalho durante a produção de queijo, e presente no soro de leite, também aumentou. Estes resultados demonstram que a *P. fluorescens* também produz o CMP verdadeiro, obtido pela hidrólise enzimática da k-caseína entre os aminoácidos 105-106, como ocorre com a ação enzimática da renina na produção de queijo. Com 8 dias de incubação houve a redução na concentração de CMP, provavelmente devido a extensa proteólise que ocorreu no leite. Nesse caso a proteólise foi tão extensa que o próprio CMP foi hidrolisado, e o leite já estava coagulado. Os íons de massa 1301,2 e 1358,2 sempre aumentaram sua área com o aumento do tempo de incubação.

A análise de CMP no leite por CLAE-FR/EM foi eficaz para detectar a adição de soro de leite ao leite sem proteólise. Além disso, quando o leite foi proteolizado por enzimas de *P. fluorescens* este método conseguiu indicar que houve proteólise. Porém, quando o leite estiver proteolizado por *P. fluorescens*, e estiver sido adicionado de soro, não tem como quantificar o CMP que foi produzido somente pela *P. fluorescens* e o que foi devido somente à adição de soro. Dessa forma, o resultado do Índice de CMP, como previsto na IN 69/2006, é um excelente indicador da intensidade de proteólise das proteínas do leite, ou então da adição fraudulenta do leite com soro de leite, quando analisado por CLAE-FR/EM, sendo um indicador eficiente da qualidade do leite.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.M.; BARACH, J.T & SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**. v.58, n.6, p. 828-834, 1975.

ALAIS, C. Etude des substances azotées non protéiques (NPN) séparées de la caseine du lait de vache sous l'action de la présure. **14 th Intern. Dairy Congr.**, Rome, v.2, p.823,1956.

ALVIM, T.C. Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho – Filtração Gélida (GF- HPLC). 1992. 69.f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1992.

ARMSTRONG, C.E.; MACKINLAY, A. G.; HILL, R.J.; WAKE, R.G. The action of rennin on K-casein: the heterogeneity and origin of the soluble product. **Biochim. Biophys. Acta**, 140 123-131, 1967.

ASCHAFFENBURG, R. Reviews of the progress of dairy science. Genetic variants of milk proteins: their breed distribution. **J. Dairy Res.**, 35(3): 447-460, 1968.

BRANDÃO, S.C.C.; PARREIRA, J.F.M. & ALVIM, T. da C. Detecção da adição de soro de queijo ao leite. In: **Anais do X Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 1988. 41 p.

BRASIL. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova a **Inclusão de Citrato de Sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T)**.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os **Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Diário Oficial da União, 20 de setembro de 2002, Seção 1, Página 13. Ministério da Agricultura e Abastecimento.

BRASIL. Instrução Normativa nº 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, 14 de dezembro de 2006, Seção 1, Página 8. Ministério da Agricultura e Abastecimento.

BRASIL. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui critério de **Avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP”**, de que trata a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União, 15 de dezembro de 2006, Seção 1, Página 67. Ministério da Agricultura e Abastecimento.

BRODY, E.P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **British Journal of Nutrition**. v.84, suppl. 1, p.39-46, 2000.

BURAGLIA, B. M.; **Detección de caseinato y suero en leche y productos lácteos mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectroscópicas**. 2001. 227 f. Tese (Faculdade de Farmácia)-Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2001.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 43.f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

CHERNOVA, LA; SHATAEVA, L.K.; ABRASHAEV, L; VELCHEVA, P. & SAMSONOV, G.V. Glycomacropeptide from K-casein as a substrate from neuramidase. **Dairy Sei. Abst.** v.50, n.3, p.160, 1988.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicotróficas. **Indústria de laticínios.** Jul/ago, p. 71-73, 2000.

DALGLEISH, D.G. Analysis by fast protein liquid chromatography of variants of  $\kappa$ -casein and their relevance to micellar structure and renneting. **J. Dairy Res.** v.53, n.1, p.34-51, 1986.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UAT milk – a review. **Institution Chemical of Engineers**, v. 79, p. 197-210, 2001.

DESAMASURES, N., GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **J. Dairy Res.** v. 64, p. 271-280, 1997.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. **Applied and Environmental Microbiology.** v.69, n.1, p.130-138, 2003.

DRACZ, S. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite.** 1996. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 1996

FAGUNDES, C.M; FISCHER, V; SILVA, W.P; CARBONERA, N; ARAÚJO, M.R.. Presença de *Pseudomonas spp* em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural.** Santa Maria-RS, v. 36, n. 2, p. 568-572, mar./abr. 2006.

FENNEMA, O.R. **Química de los Alimentos.** Espanhã: Editora Acribia S.A., 2000.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOURNET, B.; FIAT, A. M.; LAÍS, C.; JOLLES, P. Cow k-cassein structure of the carbohydrate portion. **Bioch. Biophys. Acta (Protein Structure)**, v.576, p.339-346, 1979.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.1370-1400, 1989.

FUKUDA, S.P. **Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite.** 1992. 142f. Dissertação ( Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 1992.

- FUKUDA, S.P.; **Estudo da correlação entre o método da ninidrina acida e cromatografia liquida de alta eficiência para a dosagem de Glicomacropéptideo e Caseinomacropéptideo em leite**. 2003. 135f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2003.
- GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "longa vida"**. 1996. 108f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 1996.
- GONZALEZ-LLANO, D.; POLO, C.; RAMOS, M. Update on HPLC and FPLC analysis of nitrogen compounds in dairy products. **Lait**. v.70, n.3, p. 255-277, 1990.
- GOURSAUD, J. Composition et propriétés physico-chimiques. In: LUQUET, F.M. (ed.) *Laits et produits laitiers. Vache, Brebis, Chèvre*, v.1, de la mamelle à la Laiterie. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, 1985.
- HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de Microbiologia de alimentos**. Vol.1.. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2004.
- HOOYDONK, A.C.M van; OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. **Neth. Milk Dairy J.** v.36, n.2, p.153-158, 1982.
- HOOYDONK, A.C.M van; OLIEMAN, C.; HAGEDOORN, H.G. Kinetics of the chymosin-catalysed proteolysis of k-caseína in milk. **Neth. Milk Dairy J.** v.37, n.(4): 207-222, 1984.
- JONG, de N.; VISSER, S. & OLIEMAN, C. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A.** v.652, p. 207-213, 1993.
- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R. & LADISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science.** v.74, n. 10, p. 3275-3283, 1991 a.
- LAW, B. A.; ANDREWS, A. T. and Sharpe, M. E., 1977, Gelation of ultrahigh temperature-sterilized milk by proteinases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk, **J Dairy Res.**, v.44, n.1, p.145-148.
- LOPEZ-FANDIÑO, R.; RAMOS, M. Revision: El caseinomacropéptideo bovino. II Detection de la presencia de suero de queseria en produtos lácteos. **Ver. Esp. Cienc. Technol. Aliment.**, v. 33, n.1, p.1-12, 1993.
- LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no Desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no Leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71f. Dissertação ( Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

McKELLAR, R. C. Development of off-flavor in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. **Journal of Dairy Science**. v.64, n.11, p. 2138-2145, 1981.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. ASSESSORIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA. **Projeções do agronegócio mundial e do Brasil 2006/07 a 2017/2018**. Disponível em: < [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em Setembro de 2008

MITCHELL, G. E.; EWINGS, K.N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UAT-treated milk. **J. Dairy Sci. Technol.** v.20, n.1, p.65-76, 1985.

MOLLÉ, D.; LÉONIL, J.; Heterogeneity of the bovine K-casein caseinomacropéptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.708, p.223- 230, 1995.

MOLLÉ, D.; LÉONIL, J.; Quantitative determination of bovine k-casein macropéptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**. v.15, p.419-428, 2005.

MOTTAR, J.; VAN RENTERGHEM, R.; VILDER, J. Evaluation of the raw material for UAT milk by determining the degree of protein breakdown through HPLC. **Milchwissenschaft**. v. 40, n.12, p. 717-721, 1985.

NONI, I. D.; RESMINI, P.; Identification of rennet-whey solids in “traditional butter” by means of HPLC/ESI-MS of non-glycosylated caseinomacropéptide A. **Food Chemistry**. v.93, n.1, p. 65-72, 2005.

OLIEMAN, C.; BENDEM, J.W, VAN DEN. A sensitive method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. **Neth. Milk Dairy J.**, v.37, p.27-36, 1983.

OLIEMAN, C.; VAN RIEL, J.A.M. Detection of rennet whey solids in skim milk and buttermilk powder with reversed phase HPLC. **Neth. Milk and Dairy J.**, v.43, n.2, p. 171-184, 1989.

OLIVA, Y.; ESCOBAR, A.; PONCE, P. Caseinomacropéptido bovino: una alternative para la salud. **Rev. Salud Anim.** v.24, n.2, p. 73-81, 2002.

PICARD, C.; PLARD, I.; RONGDAUX-GAIDA, D. & COLLIN, J.C. Detection of proteolysis milk stored at low temperatura by an inhibition ELISA. **J. Dairy Res.**, v.61, n.3, p.395-404, 1994.

PICARD, C.; PLARD, I. & COLLIN, J.C. Application of the inhibition ELISA method to the study of proteolysis caused by heat-resistant *Pseudomonas* proteinases specific towards K-casein in heated milk. **Milchwissenschaft**, v.51, n.8, p. 438-442, 1996.

RECIO, I.; LÓPEZ-FANDINO, R.; OLANO, A.; OLIEMAN, C. & RAMOS, M. Study of the formation of caseinomacropptides in stored ultra-high-temperature-treated milk by capillary electrophoresis. **Journal Agricultural and Food Chemistry** **44** (12): 3845-3548, 1996 a.

RECIO, I.; FRUTOS de, M.; OLANO, A.; RAMOS, M. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal Agricultural of Food Chemistry** **44** (12): 3955-3959, 1996 b.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; Characterization of peptideos produced by the action of psychrotrophic on Kappa-casein. *Journal of Dairy Research*, v.67, n.4, p.625-630, 2000 a.

RECIO, I.; GARCÍA- RISCO, M. R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; RAMOS, M.; Detection of rennet whey solids in UAT milk by capillary electrophoresis; **International Dairy Journal** **10**, p. 333-338, 2000 b.

RICHARDS, N.S.P.S. Uso racional de soro lácteo. **Revista Indústria de Laticínios**, v.2, n.9, p. 67-69, 1997.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**. v.8, n.8, p. 432-437, 1994.

SILVESTRE, M.P.C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Chemistry**. v.60, n.2, p. 263-271, 1997.

SIUZDAK, W.M.A. Mass spectrometry for biotechnology. **Academic Press**. 1996.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**. v.8, n.2, p. 35-37, 1997.

STOFER, W.; HICKS, C. L. Pernicious psychrophiles – Their effect on cheese yield and composition. **Cultured Dairy Production Journal**, v. 18, p. 11-14, 1983.

SYMONS, M.H.; EWINGS, K. N. Monoclonal antibodies reactive to some *Pseudomonas fluorescens* proteases. **Aust. J. Dairy Tech.** v. 45, n.1, p. 31-33, 1990.

THOMÄ, C.; KRAUSE, I.; KULOZIK, U. Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. **Int. Dairy J.** v.16, n.4, p. 285-293, 2006.

TULLIO, L. T., **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

VIEGAS, R. P.; RESENDE, M. F. S.; CALDEIRA, L. A.; PENNA, C. F.A. M.; CREQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. SOUZA, M. R. S.; Avaliação da qualidade Físico-química do Leite UAT desnatado comercializado em Belo Horizonte-MG. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**, Candido Tostes, Nº 351, Vol. 61, 85-87; Juiz de Fora; JUL/ AGO de 2006

VILELA, S.C. **Deteccion de suero de queseria agregado a leche pasteurizada y leche en polvo. Determinacion del glicomacropéptido por electrophoresis.** 1987, 81f. Dissertação (Mestardo)-Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile 1987

VREEMAN, H.J.; VISSER, S.; SLANGEM, C.J.; RIEL, J.A.M. Characterization of bovine k-casein fraction and the kinetics of chimosin induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fraction determined by high-performance gel permeation chromatography. **Biochem. J.** v.240, p.87-97, 1986.

WALSTRA, P.; JENNES, R. **Dairy Chemistry and Physics.** New York, John Wiley and Son. 1984, 467 p.

WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of silaic acid. **J. Biol. Chem.** v.234, n.8, p.1971-1975, 1959.

WOLFSCHOO-POMBO, A.F.; PINTO, A. P. E. de F. A qualitative method for detection of rennet whey in milk. **Ciência e Tec. de Alimentos.** v.5, n.2, p.111-115, 1985.

YVON, M.; CHABANET, C.; PELISSIER, J.P. Solubility of peptides in tridoroacetic acid (TCA) solutions. **Int. J. Peptide Protein Rés.,** v.34, p.116-176, 1992.