



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

LUAN VALDEMIRO ALVES DE OLIVEIRA

**MÉTODO ANALÍTICO PARA INSPEÇÃO DA AUTENTICIDADE
COMPOSICIONAL PROTEICA DE QUEIJOS FRESCOS POR LC-MS/MS**

FLORIANÓPOLIS

2022

LUAN VALDEMIRO ALVES DE OLIVEIRA

**MÉTODO ANALÍTICO PARA INSPEÇÃO DA AUTENTICIDADE
COMPOSICIONAL PROTÉICA DE QUEIJOS FRESCOS POR LC-MS/MS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio
Co-orientador: Dr. Heitor Daguer

FLORIANÓPOLIS

2022

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

de Oliveira, Luan

MÉTODO ANALÍTICO PARA INSPEÇÃO DA AUTENTICIDADE
COMPOSICIONAL PROTÉICA DE QUEIJOS FRESCOS POR LC-MS/MS /
Luan de Oliveira ; orientador, Elane Schwinden Prudêncio,
coorientador, Heitor Daguer, 2022.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Autenticidade
composicional. 3. Queijos frescos. 4. beta-lactoglobulina.
5. LC-MS/MS. I. Schwinden Prudêncio, Elane. II. Daguer,
Heitor. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV.
Título.

LUAN VALDEMIRO ALVES DE OLIVEIRA

**MÉTODO ANALÍTICO PARA INSPEÇÃO DA AUTENTICIDADE
COMPOSICIONAL PROTEICA DE QUEIJOS FRESCOS POR LC-MS/MS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Vivian Maria Burin, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Carmen Maria de Olivera Müller, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Rodrigo Barcellos Hoff, Dr.
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

Prof^a. Dra. Itaciara Larroza Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Prof^a. Elane Schwinden Prudêncio, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos iniciais são referentes as duas pessoas que foram essenciais e extremamente importantes para a conclusão desta etapa em minha vida.

Agradeço minha professora e orientadora Prof^ª. Dra. Elane Schwinden Prudêncio, por quem tenho um imenso carinho e admiração. Apenas palavras não será suficiente para descrever totalmente o apoio, dedicação e confiança que foi depositado em mim durante toda minha jornada acadêmica. Neste momento, ao final de mais uma etapa importante na minha vida, tenho a certeza que tudo foi mais fácil quando você esteve à frente, participando, instruindo e conduzindo os meus objetivos de vida. Seus ensinamentos durante toda a graduação foram essenciais e muito importante para mim. A sua orientação durante o trabalho de conclusão de curso de graduação foi imprescindível para a formação de mais um cientista de alimentos qualificado, além disso, a sua recomendação e orientação para meu trabalho de conclusão de estágio foi crucial para me empregar diretamente em um laboratório de referência nacional (Laboratório Federal de Defesa Agropecuária - LFDA), e aqui estou eu, nesse momento, agradecendo novamente por estar finalizando esta etapa de mestrado em ciência dos alimentos. Foram quase 6 anos de convivência, que percorreu a transição de um jovem sonhador com muitas expectativas e incertezas do futuro, para hoje, um homem feliz e realizado do ser humano que se tornou. Por isso e muito mais não relatado, meu gigantesco muito obrigado!

Gostaria de agradecer ao meu amigo, colega de trabalho e pesquisas, e também meu co-orientador Dr. Heitor Daguer, por quem também tenho uma enorme admiração e respeito pela pessoa que é. Foi ele quem possibilitou a realização do meu estágio obrigatório, confiou em mim e deu todo o suporte para que a realização do estágio no LFDA fosse a experiência mais incrível e enriquecedora na minha vida acadêmica e profissional. Minha convivência diária com uma pessoa como ele, que é um indivíduo muito profissional, extremamente inteligente, e surpreendentemente experiente e capacitado, torna minha trajetória de vida ainda mais promissora. Seus ensinamentos a cada dia me torna um profissional ainda mais qualificado e interessado pela área de ciência dos alimentos. Seu prazer em aprender e transferir seus conhecimentos o torna uma pessoa diferente e especial. Sua contribuição durante o período do mestrado foi massiva e grandiosa, seu auxílio na elaboração estratégica dos ensaios e discussões sobre os estudos realizados foram certos, e sem dúvida alguma, facilitou e determinou o sucesso desta etapa de conclusão de mestrado. Dessa maneira, e por muito mais não mencionado, meu imenso muito obrigado!

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina e também ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos por conceder-me uma formação de nível superior totalmente gratuita e com a qualidade de ensino de referência internacional. Agradeço também a todos os funcionários, técnicos e professores pelo auxílio, receptividade, conselhos, ensinamentos que de alguma maneira me ajudaram e incentivaram a concluir esta etapa em minha vida.

Agradeço ao meu amigo e colega de trabalho e pesquisas Dr. Rodrigo Barcellos Hoff, juntamente às minhas professoras de graduação e de pós-graduação Prof^ª Dra. Carmen Maria de Olivera Müller e Prof^ª. Dra. Vivian Maria Burin, por compartilharem seus conhecimentos, me ajudarem nesses ensinamentos, pelas atenções durante todo o período acadêmico e pela ajuda na conclusão desta dissertação. Fiquei extremamente feliz pelo aceite de todos vocês para constituírem a banca examinadora deste trabalho e agradeço imensamente pelas grandiosas contribuições.

Agradeço a todos meus colegas de pesquisa do Laboratório de Leite e Derivados e aos meus colegas do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária pelo imensurável apoio e ajuda durante todo o processo desta pesquisa.

Por fim, agradeço aos meus pais Ângela e Valdemiro e à família como um todo por serem minhas inspirações diárias. Obrigado por todo apoio e confiança inigualável. Sempre foi por mim e por vocês!

RESUMO

Com o aumento do número de indústrias de laticínios de médio e pequeno porte, o consumo e a produção de queijos também têm aumentado nas últimas décadas, fazendo com que a segurança e a autenticidade dos produtos lácteos se tornem crescente motivo de preocupação. Por essa razão, fica perceptível a importância dos métodos analíticos que permitam a caracterização de produtos lácteos e a detecção de práticas comerciais fraudulentas, protegendo os consumidores e os fabricantes de produtos conformes. Uma adulteração já conhecida é a fabricação de queijos frescos como o Minas Frescal com soro de leite como matéria-prima majoritária. Dessa maneira, com o objetivo de desenvolver, validar e aplicar um método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem (LC-MS/MS) para detectar adulterações de queijo frescos, esta dissertação foi desenvolvida em dois capítulos. O primeiro capítulo foi organizado a partir de uma revisão bibliográfica com os principais tópicos relacionados aos produtos lácteos. Além disso, foram destacadas vantagens da aplicação de LC-MS/MS, bem como a importância da abordagem proteômica na avaliação de adulteração de produtos alimentícios. O segundo capítulo contemplou todas as etapas realizadas durante o desenvolvimento, validação e aplicabilidade do método LC-MS/MS. Nesse capítulo, foi descrita a utilização da abordagem proteômica *bottom-up* e a técnica LC-MS/MS para avaliar a adulteração de queijos frescos, utilizando como marcador o peptídeo TPEVDDEALEK, obtido por digestão triptica da β -lactoglobulina. O método desenvolvido é simples, prático e possui reprodutibilidade satisfatória, apresentando poucas etapas de preparo de amostra e utilizando solventes de baixa toxicidade. A validação analítica intralaboratorial quantitativa e qualitativa confirmou a especificidade, precisão e a recuperação do método desenvolvido, fornecendo evidências de que os requisitos específicos para uso em rotina analítica foram atendidos. O método desenvolvido foi comparado ao método de referência que utiliza eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Houve coincidência dos resultados obtidos pelas duas técnicas para amostras reais e sua aplicabilidade também foi satisfatória, apresentando 100% de confiabilidade na obtenção de respostas qualitativas (amostras autênticas e não autênticas). Dessa forma, o método descrito nesta dissertação poderá ser utilizado como alternativa a SDS-PAGE na avaliação de adulteração de queijo frescos com soro de leite.

Palavras-chave: Adulteração de alimentos. Laticínios. LC-MS/MS. Validação analítica.

ABSTRACT

With the increase in the number of medium and small dairy industries, the consumption and production of cheese has also increased in recent decades, making the safety and authenticity of dairy products an increasing focus and cause for concern. The availability of analytical methods that allow the characterization of dairy products and the detection of economically motivated adulterations is essential to protect consumers and manufacturers of compliant products. A well-known adulteration is processing fresh cheeses such as Minas Frescal by replacing milk by whey as the main raw material. Thus, with the objective of developing, validating, and applying an analytical method by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to detect the adulteration of fresh cheeses with whey, this dissertation was arranged in two chapters. The first chapter was based on a literature review with the main topics related to dairy products. In addition, advantages of the instrumentation used (LCMS/MS) were highlighted, as well as the importance of proteomics in the evaluation of adulteration of food products. The second chapter covered all the steps carried out during development, validation, and applicability assessment of the proposed LC-MS/MS method. In this second chapter, the use of a bottom-up proteomics approach and the LC-MS/MS technique was described to evaluate the adulteration of fresh cheeses, using the peptide TPEVDDEALEK, obtained by tryptic digestion of β -lactoglobulin, as adulteration marker. The developed method is simple, practical and has satisfactory reproducibility, with few sample extraction steps and using low toxicity solvents. Quantitative and qualitative intra-laboratory analytical validation confirmed the specificity, precision, and recovery of the experimentally developed method, providing evidence that the specific requirements for use were met. The LC-MS/MS was compared to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). There was a coincidence of the results obtained by the two techniques for real samples and their applicability was also satisfactory, presenting 100% reliability in obtaining qualitative answers (authentic and not authentic samples). The method described in this dissertation can be used as an alternative to SDS-PAGE in the evaluation of adulteration of fresh cheeses with whey.

Keywords: Food adulteration. Dairy products. LC-MS/MS. Analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Etapas do processo de produção de queijos frescos (queijo Minas Frescal).....	20
Figura 2 – Alinhamento da β -lactoglobulina de diferentes espécies de ruminantes e diferenças de aminoácidos em relação à espécie bovina.	23
Figura 3 – Esquema básico dos protocolos proteômicos <i>bottom-up</i> , <i>middle-down</i> e <i>top-down</i>	30

CAPÍTULO 2 – A REFERENCE METHOD TO DETECT FRESH CHEESES ADULTERATION WITH WHEY BY LC-MS/MS

Figure 4 – Amino acids chain of bovine β -lactoglobulin, with the cleavage sites and the candidate peptides obtained by tryptic digestion.....	56
Figure 5 – Efficiency evaluation of the enzymatic digestion of β -lactoglobulin (BLG) using trypsin for the production of the peptide <i>TPEVDDEALEK</i> and liquid chromatography coupled to mass spectrometry for its detection and quantitation.	59
Figure 6 – Extracted ion chromatograms for the quantitative m/z transitions of the five candidate marker peptides of BLG, yielded by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. .	60
Figure 7 – Distribution histogram of measurements (n = 207) of basal concentrations of the peptide <i>TPEVDDEALEK</i> in samples of authentic cheeses, yielded by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.....	62
Figure 8 – Part A: comparison of results yielded by LC-MS/MS and SDS-PAGE. Partial electropherograms and graphic plots. Part B: overlaid extracted ion LC-MS/MS chromatograms of the quantitative transition of the adulteration marker peptide in authentic and fortified cheese samples.	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica

Tabela 1 – Proteínas do leite bovino e algumas de suas características químicas..... 21

Tabela 2 – Frações de proteínas do leite (g L^{-1}) de diferentes espécies animais..... 22

CAPÍTULO 2 – Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey

Tabela 3 – Optimized mass spectrometry parameters* for detection and quantitation of candidate adulteration marker peptides obtained by tryptic digestion of β -lactoglobulin..... 50

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 1	17
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 LEITE E PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE	18
1.1.1 Fabricação de queijos frescos	20
1.2 PROTEÍNAS DO LEITE	21
1.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA QUEIJOS	24
1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	26
1.5 PROTEÔMICA	28
1.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	31
1.7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2 (Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey)	42
ABSTRACT	43
1 INTRODUCTION	44
2 MATERIAL AND METHODS	45
2.1 REAGENTS, STANDARDS, AND SOLUTIONS	45
2.2 SAMPLES	46
2.3 SELECTION OF THE ADULTERATION MARKER PEPTIDE	46
2.4 EXTRACTION OF BLG	47
2.5 ENZYMATIC DIGESTION	47
2.6 LC-MS/MS ANALYSIS	48
2.7 ESTABLISHMENT OF THE ACTION LEVEL	51
2.8 METHOD VALIDATION	51
2.8.1 Selectivity	51

2.8.2	Matrix effect	51
2.8.3	Linearity	52
2.8.4	Recovery and precision	52
2.8.5	False-positives and false-negatives rate	52
2.8.6	Analytical limits	53
2.8.7	Expanded standard uncertainty	53
2.9	APPLICATION STUDY AND METHOD COMPARISON	53
3	RESULTS AND DISCUSSION	54
3.1	PROTEIN CONTENT	54
3.2	SELECTION OF THE ADULTERATION MARKER PEPTIDE	54
3.3	BLG EXTRACTION AND ENZYMATIC DIGESTION	57
3.4	LC-MS/MS ANALYSIS	59
3.5	ESTABLISHMENT OF THE ACTION LEVEL.....	60
3.6	ANALYTICAL VALIDATION.....	62
3.7	METHOD COMPARISON AND APPLICABILITY STUDY	65
4	CONCLUSION	66
	REFERENCES	67
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
	ANEXO A – Artigo publicado “Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey” na revista Food Research International.	71

INTRODUÇÃO

Queijos estão entre os alimentos mais antigos fabricados pelo homem. Dentre os milhares tipos de queijo fabricados no mundo, os queijos brancos (ou queijos frescos) estão entre os mais populares, devido à simplicidade do seu processamento. São vários os tipos de queijos frescos que podem ser produzidos com leite de vaca, cabra, ovelha ou de outras espécies animais, dentre eles o típico queijo brasileiro Minas Frescal, o queijo grego Fetta e o queijo sírio Chanliche. Por serem alimentos processados em grandes quantidades nos mais diversos países do mundo, são passíveis de serem objetos de práticas comerciais enganosas.

Magenis *et al.* (2014b) demonstraram haver uma forte diferença entre a composição proteica das amostras de queijo tipo Minas Frescal (elevada concentração de caseínas) em comparação às amostras não conformes (com elevada concentração de proteínas do soro de leite) sugerindo que, quando ocorre a adulteração composicional desses produtos, o leite é misturado com soro de leite durante a produção do queijo. A β -lactoglobulina (BLG), por ser a principal proteína na composição do soro de leite, foi escolhida como marcador de adulteração para avaliar a autenticidade composicional do queijo Minas Frescal. Desde então, um método qualitativo foi validado pela Seção Laboratorial Avançada em Santa Catarina (SLAV/SC) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e tem sido utilizado na rotina analítica de fiscalização de produtos do Serviço de Inspeção Federal brasileiro (MAGENIS *et al.*, 2014b). Esse método utiliza a técnica eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). A técnica, inicialmente descrita por Laemmli (1970), hoje possui inúmeras aplicações nas áreas da Química e da Biologia. No entanto, apesar de ser altamente seletiva e reprodutível, a técnica SDS-PAGE exige o preparo de várias soluções e possui limitações para fornecer respostas quantitativas. Além disso, utiliza espécies químicas tóxicas (acrilamida, β -mercaptoetanol e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) e demanda operadores experientes para adequada solubilização das proteínas e preparo dos géis (CANTRELL *et al.*, 2021).

A análise global de proteínas, chamada de proteômica, é a identificação, caracterização e quantificação em grande escala de proteínas em um sistema biológico. Uma das abordagens amplamente utilizadas para análise proteômica é a *shotgun*, que se refere, de forma geral, à avaliação de proteínas baseada na identificação de peptídeos precursores gerados por hidrólise enzimática. Essa abordagem pode ser direcionada pela separação cromatográfica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas para detecção, identificação e quantificação das proteínas (ou peptídeos) (ORTEA *et al.*, 2016). O procedimento de hidrólise

enzimática para a digestão de proteínas em análise proteômica envolve o uso de diferentes tipos de enzimas proteolíticas (proteases), como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase ou alcalase, sendo a tripsina considerada o padrão-ouro em proteômica *shotgun*. Em geral, as enzimas proteolíticas diferem por sua seletividade e especificidade para clivar as ligações amida entre resíduos de aminoácidos em uma proteína. A clivagem é realizada através da hidrólise da ligação amida antes ou depois de um resíduo específico ou combinação de resíduos. Dessa forma, quando se utiliza a metodologia *shotgun*, a preparação de abertura e extração das amostras são etapas cruciais para a excelência do ensaio analítico, influenciando o rendimento da produção dos peptídeos e a sua estabilidade após a digestão (PICARIELLO *et al.*, 2013).

É evidente a importância de se dispor de métodos analíticos que permitam a caracterização de produtos lácteos onde práticas comerciais fraudulentas possam ocorrer. Técnicas analíticas como a cromatografia líquida (LC) e gasosa (GC), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), reação em cadeia da polimerase (PCR), além de técnicas espectroscópicas como espectroscopia de fluorescência, infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR), ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras, são essenciais para lidar com os problemas relacionados à identificação e autenticação de produtos alimentares (KHAN *et al.*, 2021). Dentre essas técnicas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem sido utilizada no controle de autenticidade de leite e seus produtos lácteos (ZHU *et al.*, 2021). Além disso, esses métodos possuem grande utilidade no apoio às autoridades reguladoras na prevenção de fraudes em produtos alimentícios, contribuindo para a proteção dos consumidores e os fabricantes de alimentos que atuam em conformidade com as normas legais.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método usando LC-MS/MS com uma abordagem estratégica *shotgun* do tipo *bottom-up* para detectar a adulteração de queijos frescos quando o leite é substituído e/ou misturado com soro de leite. O método foi submetido à validação analítica intralaboratorial e à avaliação de aplicabilidade pela análise de amostras reais. Os resultados obtidos foram comparados ao método de referência de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE).

A dissertação foi organizada em dois capítulos:

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica, a qual aborda os principais temas envolvidos no trabalho: leite e produtos derivados do leite, adulteração de queijos frescos, características químicas das proteínas do leite, fundamentos de análise proteômica e, por fim, a importância da validação analítica.

Capítulo 2 – Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey, o qual descreve o desenvolvimento do método analítico para detectar a adulteração de queijos frescos por LC-MS/MS, sua validação intralaboratorial e aplicação a amostras reais.

REFERÊNCIAS

CANTRELL, Maranda S. *et al.* Biomedical rationale for acrylamide regulation and methods of detection. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 2176-2205, 2021.

KHAN, Mati Ullah *et al.* Whey allergens: Influence of nonthermal processing treatments and their detection methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 5, p. 4480-4510, 2021.

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

MAGENIS, Renata B. *et al.* A control method to inspect the compositional authenticity of minas frescal cheese by gel electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8333-8339, 2014b.

ORTEA, Ignacio *et al.* Review on proteomics for food authentication. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 212-225, 2016.

PICARIELLO, Gianluca *et al.* Protein digestomics: Integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 120-134, 2013.

ZHU, Dan *et al.* Milk biomarkers in relation to inherent and external factors based on metabolomics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 51-64, 2021.

CAPÍTULO 1
Revisão bibliográfica

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 LEITE E PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE

O leite é uma excelente fonte de macro e micronutrientes e rico em compostos com inúmeras funcionalidades nutricionais. O leite pode ser convertido em uma série de produtos lácteos, cada um com sua particularidade composicional e de processamento tecnológico, o que torna esses produtos parte do cotidiano alimentar da maioria das pessoas, constituindo cerca de 25-30% da dieta de um indivíduo (KHAN, 2019).

O leite é um dos produtos mais consumidos em todo o mundo. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) relatou que 6 bilhões de pessoas consomem leite e ou produtos lácteos, ou seja, mais de dois terços da população mundial, sendo a maior parte por países desenvolvidos (FAO, 2020). A Índia é o maior produtor de leite do mundo, com 22% da produção global, seguida pelos Estados Unidos, China, Paquistão e Brasil (FAO, 2020). Segundo a FAO (2021), o rebanho bovino produz 81% da produção mundial de leite, seguido por búfalas com 15%, cabras com 2% e ovelhas com 1%, enquanto camelas fornecem 0,5%. Cerca de um terço da produção de leite nos países em desenvolvimento vem de búfalas, cabras, camelas e ovelhas. Nos países desenvolvidos, quase todo o leite é produzido pelo rebanho bovino. A produção mundial de leite deve crescer 1,7% por ano, atingindo cerca de 981 milhões de toneladas até 2028, o que representa um crescimento mais rápido do que a maioria das outras *commodities* (FAO, 2021).

A participação de produtos lácteos frescos no consumo mundial deverá aumentar na próxima década devido ao grande crescimento da demanda nos países em desenvolvimento, impulsionado pelo aumento da renda e crescimento populacional (LAGRANGE *et al.*, 2015). O leite e seus produtos derivados possuem um impacto muito grande sobre a economia mundial, pois pode oferecer aos produtores de pequeno e médio porte uma alternativa de renda e melhores oportunidades para alcançar mercados regionais e urbanos (FAO, 2020). Os produtos lácteos com maior incidência de comercialização no mercado mundial são queijo, manteiga e leite em pó. Segundo dados obtidos até o ano de 2020, queijos de leite de vaca ficaram entre as dez principais *commodities* no comércio internacional, representando mais de 30 milhões de dólares (FAO, 2020). Os países desenvolvidos respondem por cerca de 55% das importações mundiais. Reino Unido, Federação Russa, Japão, União Europeia e China são projetados como os cinco maiores importadores de queijo em 2028. (FAO, 2021).

Os derivados lácteos podem ser categorizados em dois grupos: os produtos lácteos fermentados, quando passam por um processo de fermentação, a exemplo de alguns queijos, iogurte e bebidas fermentadas, e os produtos lácteos não fermentados, que não passaram por um processo de fermentação, como o próprio leite. O queijo, como um dos produtos lácteos mais antigos e importantes, é produzido mundialmente. O consumo e a produção de queijo têm aumentado nas últimas décadas. O queijo, como o segundo produto lácteo mais importante em termos de sólidos do leite, é muito consumido na Europa, América do Norte e Oceania, e espera-se que seu consumo per capita continue a aumentar (FAO, 2021). A popularidade do queijo é atribuída ao seu excelente sabor, disponibilidade de novas e diferentes variedades, conveniência e versatilidade de utilização e valor nutricional (NAGPAL, 2012).

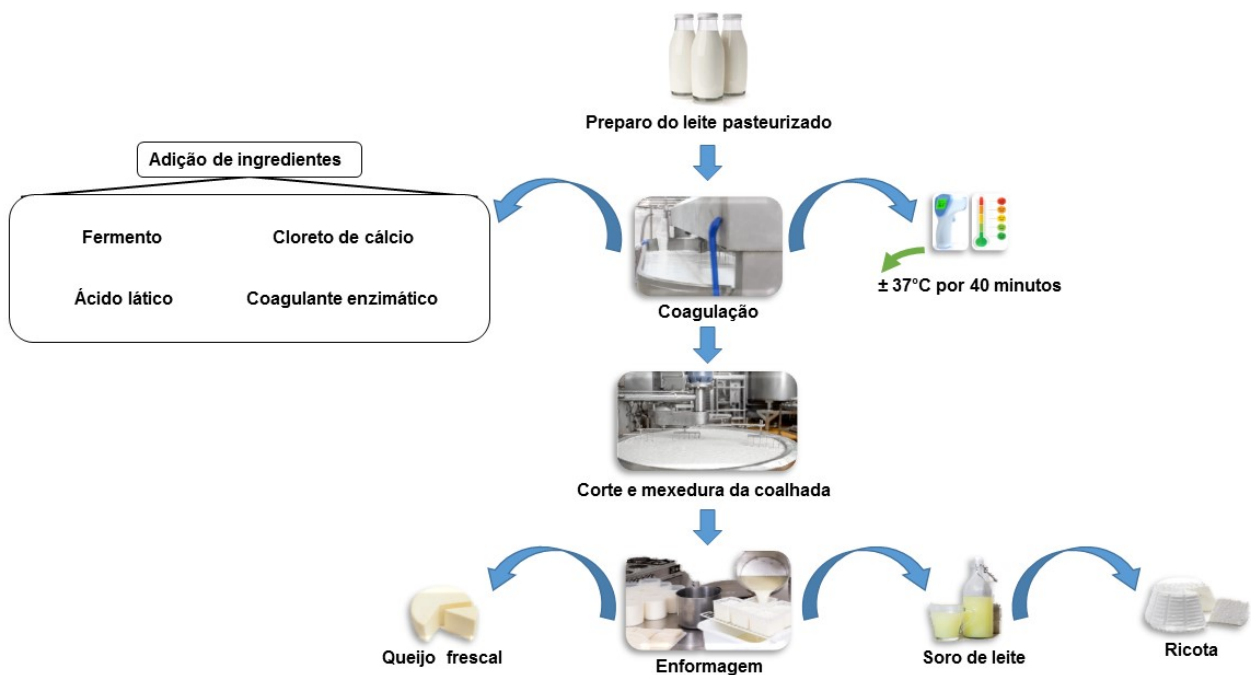
O queijo é um produto fresco ou maturado obtido pela coagulação parcial ou total do leite. A coagulação pode ser obtida por desnaturação proteica por ação ácida e ou por ação de coalhos, utilizando enzimas e ou bactérias específicas, ácidos orgânicos isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias. Os queijos podem ser macios, duros, semiduros, curados ou não. Mundialmente, são produzidas centenas de variedades de queijos que podem ser categorizados com base em diversas propriedades como textura, diferenças nas composições e tipos de leite empregado e as especificidades de fabricação, processos aplicados e micro-organismos utilizados (PERRY, 2004).

Os queijos tradicionais incluem os tipos Prato, Provolone, Parmesão e também os queijos frescos. Entende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após sua fabricação. Por definição, todo queijo deve ter como ingrediente leite e/ou leite reconstituído (integral), semidesnatado e ou desnatado. Os queijos devem obedecer aos pré-requisitos físicos, químicos e sensoriais próprios de cada variedade, estabelecidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) correspondente (BRASIL, 1996). Embora o processo básico de fabricação de queijos seja parecido, as variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam diversas variedades desses produtos. A fabricação de queijos envolve alguns procedimentos gerais e outros que são específicos de cada tipo. O leite utilizado na produção de queijos frescos tem, obrigatoriamente, que ser pasteurizado (BRASIL, 1996).

1.1.1 Fabricação de queijos frescos

A tecnologia de fabricação de queijos frescos compreende algumas etapas básicas conforme ilustrado na figura 1. O processo de fabricação é iniciado pela coagulação do leite, podendo ser feita diretamente pela microbiota do leite, ou pela adição de cultivo bacteriano e enzimas apropriados. Após um período de tempo, ao final da coagulação e inicia-se o tratamento da massa. No tratamento da massa é realizado o corte da massa, a mexedura e por último a drenagem da coalhada, com o objetivo de promover a retirada do soro de leite. A etapa de corte da massa e mexedura são cruciais para a elaboração de um queijo fresco de qualidade, haja vista que esses tipos de queijos possuem alta umidade. Portanto, durante a etapa de corte, devem ser formados quadrados de 1,5 a 2,0 cm de aresta. A agitação dos cubos deve ser realizada durante um minuto e, em seguida, os mesmos devem ser deixados em repouso durante três minutos, repetindo esta operação de agitação e repouso por 30 minutos. A massa obtida é colocada em formas, dessorada e, por fim, embalada e armazenada sob refrigeração (EMBRAPA, 2005).

Figura 1 – Etapas do processo de produção de queijos frescos (queijo Minas Frescal).



1.2 PROTEÍNAS DO LEITE

O leite é uma importante fonte de nutrientes para a dieta humana, fornecendo cerca de 3 g de proteína por 100 g de leite (para o leite bovino, que constitui cerca de 85% do consumo global). As proteínas do leite podem ser agrupadas em três classes principais: (a) as proteínas de micela de caseína, organizadas como estruturas supramoleculares dinâmicas, que prendem o fosfato de cálcio coloidal (HORNE, 2020); (b) as proteínas do soro de leite, dissolvidas na fase aquosa (BAUMAN, 2006); e (c) proteínas que estão associadas dentro da membrana do glóbulo de gordura do leite, uma bicamada fosfolipídica que incorpora proteínas e que protege os glóbulos de gordura da coalescência e lipólise (DEWETTINCK, 2008). As proteínas do leite são as principais fontes de peptídeos bioativos, considerados ingredientes potenciais para alimentos funcionais promotores da saúde (GIACOMETTI *et al*, 2017).

As proteínas do leite possuem alto valor tecnológico e proporcionam efeitos fisiológicos benéficos. Além do valor nutricional, as proteínas do leite contribuem para definir as propriedades físico-químicas do leite, como solubilidade, ligação com a água, viscosidade e estabilidade ao calor (AUGUSTIN, 2007). A genética e a nutrição animal desempenham um papel importante nas proporções relativas das proteínas do leite e podem ser usadas para manipular a concentração das mesmas no leite de ruminantes (VARGAS-BELLO-PÉREZ, 2019). A tabela 1 demonstra algumas características químicas das principais proteínas do leite bovino.

Tabela 1 – Proteínas do leite bovino e algumas de suas características químicas.

Proteína	Composição em leite desnatado (g L ⁻¹)	Variantes genéticas	Massa molecular (g/mol)	Ponto isoelétrico
α_{s1} -Caseína	15	B	23.6515	4,6
		C	23.542	
α_{s2} -Caseína	4	UMA	25.226	4,9
		A1	24.023	
β -Caseína	11	A2	23.983	---
		B	24.092	
κ -Caseína	4	UMA	19.037	5,5
		B	19.006	
β -Lactoglobulina	4	UMA	18.363	5,13
		B	18.277	
α -Lactoalbumina	1,7	B	14.178	4,3

Fonte: Adaptado de Farrel Jr. *et al.* (2004).

As caseínas, principalmente α -s-caseína (α -s1 e α -s2), β -caseína e κ -caseína, representam cerca de 80% das proteínas do leite bovino. Proteínas de soro de leite, como β -lactoglobulina, α -lactalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas, albumina sérica, glicomacropéptidos e enzimas representam os outros 20% (BAUMAN, 2006). As proteínas do soro de leite são solúveis no líquido residual após a precipitação das caseínas em pH 4,6 a 20°C (FARRELL JR. *et al.*, 2004). A caseína, por ser a maior fração proteica do leite e possuir uma elevada diversidade de aminoácidos de alta digestibilidade, é muito relevante para a alimentação humana. As caseínas estão presentes sob a forma de micelas, cuja estrutura é a base para a fabricação de queijos, permitindo a fácil separação dos componentes proteicos do soro de leite (HORNE, 1998).

A composição das proteínas do leite também pode variar entre as principais espécies produtoras de leite em função de muitos fatores, como a raça, o estágio da lactação, entre outros. O leite de ovelha geralmente contém concentrações mais altas de caseínas e β -lactoglobulina em comparação ao de vaca, búfala e cabra (VARGAS-BELLO-PÉREZ, 2019). A tabela 2 apresenta valores das frações de proteínas do leite de diferentes espécies (bovina, ovina, caprina e bubalina).

Tabela 2 – Frações de proteínas do leite (g L^{-1}) de diferentes espécies animais.

Proteína	<i>Bos taurus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Bubalus bubalis</i>
α _{s1} -Caseína	10,7	22,1	13	8,9
α _{s2} -Caseína	3,4	22,1	11,6	5,1
β -Caseína	9,3	17,6	29,6	20,9
κ -Caseína	3,3	4,3	13,4	5,4
β -Lactoglobulina	3,3	8,5	5	3,9
α -Lactalbumina	1,3	1,9	2,3	1,4

Fonte: Vargas-Bello-Pérez (2019) com modificações.

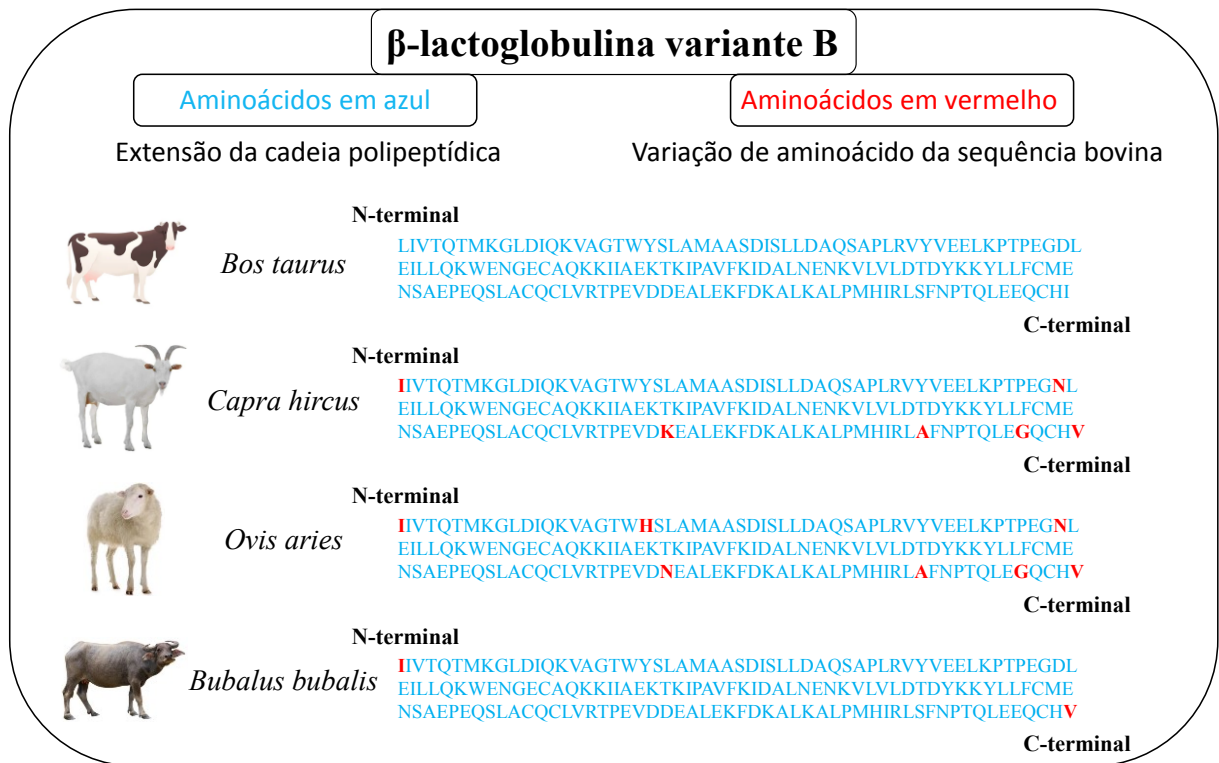
1.2.1 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina (BLG) é a proteína majoritária do soro do leite e está presente no leite de vaca em concentrações que variam de 1,8 a 5,0 g L^{-1} (KONTOPIDIS *et al.*, 2004). A BLG do leite de ruminantes é uma proteína globular dimérica com estruturas secundárias e terciárias bem definidas em pH fisiológico, onde os oligômeros estão ligados de forma não covalente. Possui estrutura de folha β -pregueada onde se forma um cálice típico das lipocalinas,

que serve de sítio para ligação de compostos hidrofóbicos de baixa massa molecular (BOLAND, 2011).

A BLG possui diferentes variantes genéticas e sua cadeia de aminoácidos é específica de cada espécie animal. Para ilustrar essas diferenças, a figura 2 apresenta a cadeia dos 162 resíduos de aminoácidos da BLG alinhadas em posições idênticas para as espécies bovina, caprina, ovina e bubalina. Além disso, as duas principais variantes genéticas da BLG bovina (A e B) diferem quanto às posições dos resíduos 80 (Asp/Gly) e 134 (Val/Ala). A variante B é a proteína de referência, cujo ponto isoelétrico é 4,83. O peptídeo inicial da BLG é composto por 16 aminoácidos, formando a pré-forma de BLG com o total de 178 resíduos de aminoácidos. Cada monômero da variante B possui uma cadeia com 162 resíduos de aminoácidos (Asp₁₀, Asn₅, Thr₈, Ser₇, Glu₁₆, Gln₉, Pro₈, Gly₄, Ala₁₅, Cys₅, Val₉, Met₄, Ile₁₀, Leu₂₂, Tyr₄, Phe₄, Lys₁₅, His₂, Trp₂, Arg₃), com fórmula molecular C₈₁₇H₁₃₁₄N₂₀₆O₂₄₇S₉, que corresponde à massa molecular de 18.277 g mol⁻¹. A estrutura da BLG contém duas pontes dissulfeto que estabilizam a proteína, conectando os aminoácidos cisteína das posições Cys₆₆ – Cys₁₆₀ e Cys₁₀₆ – Cys₁₁₉ e internamente um tiol na Cys₁₂₁, protegido pela α-hélice (FARRELL JR., 2004).

Figura 2 – Alinhamento da β-lactoglobulina de diferentes espécies de ruminantes e diferenças de aminoácidos em relação à espécie bovina.



Uma vez que possui todos os 20 aminoácidos essenciais, a BLG possui alto valor nutricional (BOLAND, 2011). A BLG está entre as mais ricas fontes alimentícias de leucina, isoleucina e valina. Junto com outras proteínas do soro de leite, na forma de concentrado proteico ou isolado proteico, tem sido objeto de diversas aplicações na indústria de alimentos em função de suas propriedades tecnológicas emulsificantes, geleificantes, formadoras de espuma e estabilizante térmico (LE *et al.*, 2019).

A BLG também pode ser usada para monitoramento e diferenciação do tratamento térmico do leite UHT (ISO, 2005; GAUR *et al.*, 2018). A temperatura de aquecimento do leite (inferior a 70°C) empregada no processamento de queijos frescos não é suficiente para causar a desnaturação da BLG. No entanto, quando o leite é aquecido a altas temperaturas como no processamento UHT, pode ocorrer a agregação da BLG com micelas de caseína, propiciando a sedimentação durante o armazenamento (ANEMA, 2020). Por outro lado, a BLG é também considerada um dos principais alergênicos em alimentos e, como tal, tem sido objeto de desenvolvimento de muitos métodos analíticos para sua detecção e quantificação, sobretudo os que utilizam técnicas de separação (como a cromatografia e a eletroforese) e a espectrometria de massas (KHAN *et al.*, 2021; VAN DEN OEVER *et al.*, 2021).

1.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA QUEIJOS

No Brasil, os produtos de origem animal são inspecionados pelos governos federal, estadual ou municipal. Desde 2006, na tentativa de reduzir as restrições comerciais para os estabelecimentos inspecionados em nível estadual ou municipal e também fornecer equivalência técnica e sanitária entre os três níveis de inspeção, foi criado o Sistema Brasileiro de Inspeção (SISBI) (BRASIL, 2006). Nesse sistema, um estabelecimento autorizado, inspecionado por um serviço de inspeção estadual ou municipal oficialmente reconhecido como equivalente ao Serviço de Inspeção Federal, pode comercializar seus produtos em todo o Brasil.

Os queijos são regulados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que, por meio do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e dos RTIQs, define os requisitos regulamentares que devem ser observados pelos fabricantes (BRASIL, 1996; RIISPOA, 2017).

O queijo, segundo a legislação brasileira vigente, é um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) após coagulação por ação física do coalho, de enzimas específicas, de

bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, podendo ter agregação de substâncias alimentícias, especiarias, condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. A legislação brasileira define queijo fresco como “queijo que está pronto para consumo logo após a fabricação” (BRASIL, 1996).

Como resultado do aumento da produção de leite, a segurança e a autenticidade do leite (e de seus derivados) se tornaram área de crescente foco e preocupação pelos produtores e agências regulatórias (MONTGOMERY, 2020). A legislação de alimentos é baseada no comércio justo, proteção ao consumidor e segurança alimentar, evitando a adulteração intencional de produtos, que reduz a qualidade do alimento para fins econômicos, seja por mistura, substituição ou remoção de alguns componentes alimentares de elevado valor econômico (BARRETO, 2018).

De acordo com o RIISPOA, a substituição de leite por soro de leite na fabricação de queijos frescos é considerada uma fraude. São consideradas infrações os casos de utilização de processos, substâncias, ingredientes e aditivos e ou elaboração de produtos em desacordo com os processos de fabricação, de formulação e de composição que não atendem ao disposto na legislação específica, com o objetivo de dissimular ou de ocultar alterações, de aumentar o volume ou o peso do produto final (BRASIL, 2017). Em todos os casos, a fraude comercial pode não só afetar os consumidores desses produtos, mas também a indústria de alimentos, fazendo com que as adulterações de produtos lácteos se tornem uma grande preocupação, representando um potencial risco à saúde pública e socioeconômica (SPINK, 2011).

Uma adulteração já conhecida e evidenciada em amostras comerciais é a produção de queijos Minas Frescal produzidos com adição ou mistura de soro de leite como matéria-prima parcial e ou integral. Essa adulteração se assemelha ao processamento de fabricação de ricota, contrariando a legislação brasileira vigente para o preparo e produção de queijos frescos (MAGENIS *et al.*, 2014b). Como nem sempre é possível comprovar essa irregularidade com base nas características sensoriais do produto suspeito, a confirmação por meio de análises laboratoriais se torna essencial.

A investigação da autenticidade de alimentos tem como principal objetivo a identificação de marcadores ou grupos de marcadores para a caracterização da autenticidade ou de seus potenciais adulterantes contaminantes e utilizá-los para a identificação de problemas de autenticidade (ORTEA, 2016). Por essa razão, a autenticação da origem composicional dos produtos de queijos frescos também é importante na avaliação da qualidade, e métodos analíticos precisos e confiáveis devem estar disponíveis para fundamentar as ações de fiscalização (ORTEA, 2016). As proteínas têm sido amplamente utilizadas como espécies

marcadoras de autenticidade em produtos lácteos através de diferentes técnicas de análise como a eletroforese, cromatografia e espectrometria de massas (MASCI *et al.*, 2022; HAO *et al.*, 2022).

1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Nas últimas décadas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido uma das técnicas analíticas mais desenvolvidas, difundidas e empregadas em aplicações científicas e industriais nas áreas química, farmacêutica, médica, alimentícia e ambiental (COLLINS, 2006). A cromatografia líquida (LC) é uma técnica de separação dos componentes de uma mistura, distribuindo as moléculas desses componentes entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são dispersos ao longo das duas fases, sendo seletivamente retidos pela fase estacionária, o que resulta na migração das moléculas com diferentes tempos de retenção. Em modelos clássicos de cromatografia (fase normal), a fase estacionária é uma fase polar e a fase móvel é um solvente orgânico apolar. Ao contrário, na fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é um solvente polar. Estes modos envolvem as separações de moléculas com base em interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre as moléculas de soluto nas fases móveis e seus ligantes na fase estacionária (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utiliza como fase estacionária diferentes colunas recheadas com materiais específicos que conferem a capacidade de realizar separações e análises qualitativas e quantitativas de ampla variedade de compostos em diversos tipos de amostras, mesmo estando em baixas concentrações, com excelente resolução, seletividade e sensibilidade (MEYER, 2013; DI ESTEFANO *et al.*, 2012). Além disso, quando os analitos são altamente polares, com alto ponto de ebulição e com inúmeros substituintes em sua estrutura, a cromatografia líquida é a técnica mais versátil, principalmente em fase reversa, devido à sua solubilidade em fases móveis aquosas e por interação às fases estacionárias apolares, sendo as mais utilizadas colunas do tipo C₈ e C₁₈ (CHIARADIA, 2008).

Diferentes detectores são utilizados para avaliar inúmeros analitos separados por LC. As vantagens da seletividade e eficiência de separação da LC são potencializadas quando essa técnica é acoplada a um detector de espectrometria de massas (MS), que possibilita uma minuciosa informação do analito (CHIARADIA, 2008). Em comparação a detectores de LC tradicionais, como detector ultravioleta-visível (UV-vis) ou de fluorescência, detectores MS

possuem como principal vantagem a capacidade de identificação praticamente inequívoca de compostos eluídos pela LC. Além disso, uma vantagem também apreciada sobre as outras técnicas, é a capacidade de determinar com sucesso analitos em baixas concentrações em amostras complexas (KRUIVE *et al.* 2015).

Um detector MS apresenta capacidade de medir as massas de átomos e moléculas e assim identificar uma espécie química (FENN, 1989). Essa técnica consiste na ionização de elementos ou espécies moleculares em um sistema de vácuo. A ionização da amostra é fundamental, pois é necessário acelerar a massa no analisador que por sua vez faz a deflexão de íons em função da massa, velocidade e da intensidade de campos elétricos e/ou magnético. Um espectrômetro de massas é formado por duas partes: o sistema de ionização das moléculas, que promove a vaporização e carrega eletricamente os analitos, e o analisador de massas, que promove a separação dos íons de acordo com sua massa (SATO, 2002).

O desenvolvimento contínuo da instrumentação de MS permitiu um conjunto cada vez mais diferenciado de modos de operação possíveis. Entretanto, a maioria das análises realizadas com LC-MS usa detecção em tandem (abreviada como MS/MS) (KRUIVE *et al.* 2015). Em termos gerais, MS/MS significa que os íons obtidos do analito não são detectados diretamente, mas, dependendo da finalidade, alguns deles (chamados íons precursores) são selecionados, manipulados (geralmente fragmentados) e os íons resultantes (íons produto) são diretamente detectados (GROSS, 2006). Na espectrometria MS/MS, ocorre a aquisição e o estudo dos espectros dos íons produto ou íons precursores de íons selecionados pela razão massa/carga (m/z), ou de íons precursores de uma perda de massa neutra selecionada. Ao contrário do MS convencional, a espectrometria MS/MS possui a capacidade de identificação dos analitos com uma menor taxa de falsos positivos e possuir maior relação sinal-ruído (MURRAY *et al.* 2013).

Diferentes sistemas de detecção por espectrometria de massas podem ser utilizados, como os sistemas com um quadrupolo (MS), triplo quadrupolo (MS/MS), *ion trap*, por tempo de voo ou *orbitrap*. Diferentes tipos de técnicas de ionização estão disponíveis como a ionização por impacto de elétrons (EI), ionização por *electrospray* (ESI), ionização química (CI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). Ambos os modos de ionização positiva e negativa estão disponíveis na maioria das fontes de técnicas de ionização, embora o modo positivo seja amplamente utilizado, onde os íons positivos são formados com o analito protonado $[M + H]^+$. Além disso, diferentes modos de operação, como o modo *full scan*, monitoramento seletivo de íons (SIM), monitoramento seletivo de reações (SRM) e monitoramento de reações múltiplas (MRM) podem ser utilizados (KRUIVE *et al.* 2015).

Como o modo MRM fornece inúmeros dados simultâneos, é muito utilizado e aplicado em diversos métodos analíticos em diferentes áreas de pesquisa. O MRM é a aplicação de repetidas varreduras de uma relação pré-definida de íons precursores e fragmentos em razão de sua massa/carga. A utilização da técnica LC-MS/MS no modo MRM permite a análise simultânea de centenas de compostos, conferindo uma elevada especificidade e sensibilidade (GROSS, 2006). Dessa forma, muitos laboratórios de controle de alimentos passaram a utilizar a técnica LC-MS/MS para as mais diversas finalidades e para vários tipos de matrizes alimentares (VERMA *et al.* 2016; CAMERINI *et al.* 2016; HAO *et al.*, 2022). A escolha do melhor procedimento para o preparo de amostras e do sistema de detecção para a análise de matrizes complexas determinará a eficiência do método analítico.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem sido muito utilizada para identificação e quantificação de vários analitos em matrizes alimentares, reduzindo a necessidade de etapas excessivas de preparo de amostra; também diminui os resultados falsos positivos em amostras complexas e permite quantificação de baixas concentrações de analitos com diferentes características físico-químicas (RIGANO, 2019). Entretanto, componentes de uma matriz alimentícia complexa como os produtos lácteos, podem tanto melhorar quanto suprimir o sinal dos analitos quando a técnica LC-MS/MS é utilizada, gerando o fenômeno conhecido como “efeito de matriz” que deve ser avaliado caso a caso (ROGATSKY *et al.*, 2005).

1.5 PROTEÔMICA

O conceito de análise proteômica inclui a separação, identificação e quantificação de todo o complemento proteico expresso por um genoma, uma célula ou um tecido (WILKINS *et al.*, 1996). Ela inclui técnicas que permitem identificar, quantificar e estudar a expressão proteica e modificações pós-traducionais das proteínas. Entre os métodos de análise, estão a eletroforese bidimensional em gel e a espectrometria de massas. A eletroforese em gel bidimensional (2DE) é uma das metodologias mais clássicas e bem estabelecidas da proteômica. Esta metodologia é derivada da técnica de eletroforese unidimensional, que se baseia na migração diferencial de macromoléculas quando submetidas a um campo elétrico (O’FARREL, 1975).

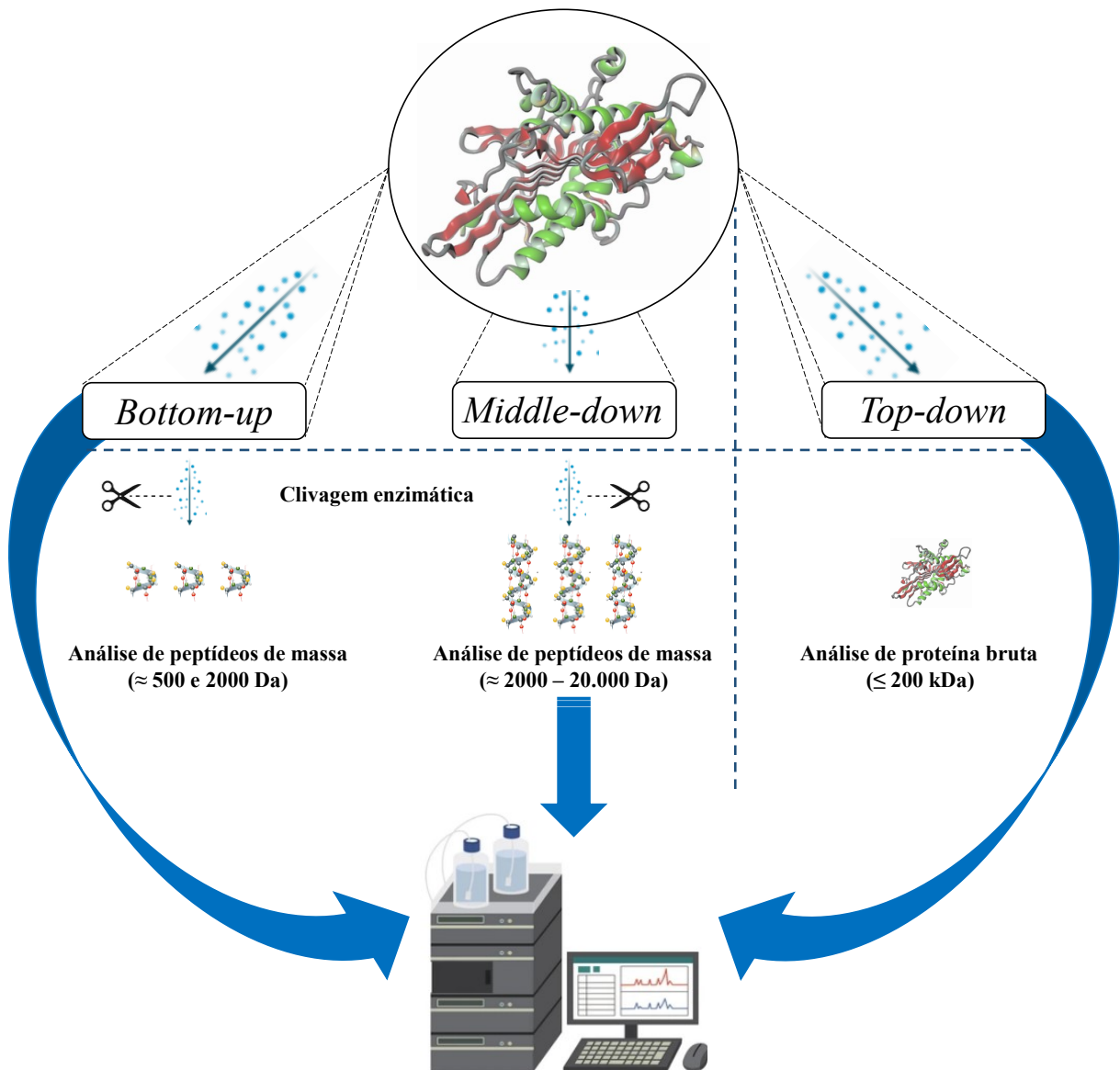
A importância da proteômica em estudos de proteínas do leite e do soro do leite durante o decorrer da última década é notável. Sua utilização está alinhada com o aprimoramento das

técnicas de separação e o desenvolvimento de analisadores de massa com alta resolução e precisão, que permitiram muitos avanços na análise de proteínas (MANSO *et al.*, 2005). A técnica LC-MS/MS potencializou a análise proteômica e se tornou muito importante para a análise de misturas complexas de proteínas, seja em termos qualitativos e ou quantitativos de proteínas e peptídeos de baixo peso molecular (MALLICK *et al.*, 2007). Atualmente, a proteômica se baseia em três pilares que incluem um método para fracionar proteínas complexas ou misturas de peptídeos, o uso de MS para adquirir os dados necessários para identificação individual das proteínas, e análise bioinformática dos dados obtidos do MS (YU, 2010).

As principais abordagens proteômicas podem ser dos tipos *bottom-up*, *middle-down* ou *top-down*. Basicamente, essas abordagens discriminam e identificam proteínas ou peptídeos derivados de clivagem enzimática utilizando proteases, como a tripsina (figura 3). Em todas as abordagens são utilizados bancos de dados contendo sequências de peptídeos, bem como informações de sua fragmentação no MS para confirmação das identidades dos peptídeos (DESIERE *et al.*, 2008).

Na abordagem *bottom-up*, um protocolo *shotgun* refere-se à identificação e quantificação de proteínas em misturas complexas usando clivagem enzimática, onde peptídeos precursores gerados pela digestão são separados por HPLC e são identificados e quantificados com MS em modo tandem. A exclusividade dos peptídeos de uma única proteína formadora é um dos principais desafios da proteômica direcionada (MALLICK *et al.*, 2007).

Figura 3 – Esquema básico dos protocolos proteômicos *bottom-up*, *middle-down* e *top-down*.



A extração de proteínas juntamente com sua digestão enzimática são as etapas mais importantes no preparo de amostras pela abordagem *bottom-up* em uma análise proteômica. O melhor protocolo de extração deve ser determinado experimentalmente para cada tipo de amostra. Existem diferentes formas que podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação para atingir um alto rendimento de extração, empregando solventes orgânicos ou detergentes; avaliação da eficácia da digestão enzimática; ruptura mecânica e/ou sonicação (BHAT *et al.*, 2021). É importante que a digestão seja eficiente, promovendo um elevado índice de clivagem das proteínas e uma elevada quantidade de peptídeos precursores, características metodológicas

dependentes dos reagentes e da enzima, essenciais para definir a especificidade e seletividade (ORTEA, 2016).

A tripsina se tornou padrão ouro na análise proteômica, principalmente na abordagem *bottom-up*. A sua fácil aquisição atribuída ao baixo custo, a facilidade de ser encontrada em grandes quantidades e sua elevada especificidade de clivagem tornam essa enzima diferenciada. Sua especificidade é associada à ocorrência da clivagem na carboxila dos aminoácidos arginina e lisina. No entanto, quando esses aminoácidos são vizinhos ao aminoácido prolina, ocorre impedimento estérico, devido ao anel aromático (KEIL, 2012). De modo geral, a tripsina é uma serina protease que seleciona sítios para hidrólise com base em duas principais características do substrato: i) presença de aminoácidos básicos na estrutura primária e ii) estruturas bem enoveladas, as quais orientam os estágios iniciais da proteólise. Os principais sítios de clivagem ocorrem em regiões pouco rígidas e na superfície da proteína (HUSTOFT, 2012). Aminoácidos básicos, fortemente associados à estrutura do substrato, ou pertencentes à estrutura secundária, não são bons candidatos à digestão pela tripsina. A proteólise pode também ser dificultada pelo “acobertamento” de aminoácidos básicos em proteínas que possuem maior número de ligações dissulfeto, o que leva a arranjos específicos em sua estrutura secundária e, conseqüentemente, um forte enovelamento. Esses fatores dificultam o acesso da tripsina aos sítios de clivagem (ORTEA, 2016).

Como os tempos de digestão típicos variam de 6 a 24 h, a digestão de proteínas é a etapa mais demorada no fluxo de trabalho proteômico (CAPELO, 2009). Com o intuito de melhorar a digestão de proteínas, a sua otimização deve ser realizada para aumento do rendimento, da reprodutibilidade e tempo suficiente para de digestão. Com esse objetivo, o uso de micro-ondas, radiação infravermelha e ultrassom tem sido recomendado. Essas otimizações devem ainda garantir a solubilização adequada e o desdobramento de todas as proteínas em uma mistura complexa para favorecer o acesso da protease aos locais de específicos de clivagem (BHAT *et al.*, 2021).

1.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

É internacionalmente reconhecido que a verificação de desempenho de métodos, independentemente da técnica analítica utilizada, é obrigatória em laboratórios com um sistema de gestão da qualidade baseado na norma internacional ISO 17025:2017 (ISO, 2017). Com esse objetivo, a validação analítica é a confirmação experimental e fornecimento de evidência

objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso de um método analítico são atendidos (THOMPSON, 2002).

Diferentes guias e regulamentos acerca dos procedimentos de validação de métodos analíticos são descritos por agências de regulação, comitês e grupos de trabalho (BRASIL, 2017; BRASIL, 2020; EURACHEM, 2016; EUROPEAN COMMISSION, 2021; ISO, 2017).

Os parâmetros de verificação de desempenho de um método analítico dependem do tipo do método e de suas características. A classificação convencional dos parâmetros é diferenciada entre termos de métodos qualitativos e quantitativos (EUROPEAN COMMISSION, 2021). A União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2021) define os métodos qualitativos como “um método analítico que detecta ou identifica uma substância ou um grupo de substâncias com base nas suas propriedades químicas, biológicas ou físicas”, enquanto a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (IUPAC, 2011) define a análise qualitativa como “análises nas quais as substâncias são identificadas ou classificadas com base em suas propriedades químicas ou físicas, como reatividade química, solubilidade, peso molecular, ponto de fusão, propriedades radiativas (emissão, absorção), espectros de massa ou meia-vida nuclear, expressando os resultados em uma escala nominal como taxas de verdadeiros e falsos positivos e negativos”. Em relação aos métodos quantitativos, a União Europeia define como “um método analítico que determina a quantidade ou a fração mássica de uma substância de forma a poder exprimi-la através de um valor numérico com as unidades apropriadas”, enquanto a IUPAC define como “análises nas quais a quantidade ou concentração de um analito pode ser determinada (estimada) e expressa como um valor numérico em unidades apropriadas. A análise qualitativa pode ocorrer sem análise quantitativa, mas a análise quantitativa requer a identificação (qualificação) dos analitos para os quais são fornecidas estimativas numéricas”.

A análise qualitativa, de forma geral, segue os princípios básicos da análise quantitativa, mas alguns conceitos específicos são aplicados na descrição das propriedades do método e na interpretação dos resultados. Um método qualitativo fornece uma resposta “positiva” ou “negativa” em uma determinada concentração de um analito (BRASIL, 2020). Este protocolo é muito visado para fins de triagem usando métodos de baixo custo ou em concentrações de analito próximas ao limite de detecção (LOD). Para caracterizar as propriedades de um método qualitativo, um método quantitativo com propriedades metrológicas superiores (método confirmatório) e LOD mais baixo, é ótimo para confirmar a presença ou ausência do analito (VALCÁREL, 2002). Além disso, as propriedades do método

qualitativo devem ser determinadas em níveis de concentrações abaixo e acima de uma concentração-alvo do analito.

Os principais guias de validação incluem avaliação da seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, incerteza de medição e robustez (embora a avaliação da robustez não seja obrigatória para alguns guias). Quando a quantificação for realizada por espectrometria de massas, torna-se necessária a avaliação do efeito de matriz e recuperação dos analitos. Quando aplicado a um método qualitativo, a validação aplica-se apenas à avaliação da seletividade e limite de detecção (EURACHEM, 2016; EUROPEAN COMMISSION, 2021).

A seletividade analítica refere-se ao grau em que um método pode ser usado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem interferência de outros componentes de comportamento semelhante (AOAC, 2002). Experimentos para avaliação da seletividade são descritos com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (THOMPSON, 2002).

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade (dentro de uma certa faixa) em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa (fortificação) e formulada como expressão matemática (equação da reta) para o cálculo da concentração do analito na amostra. Em geral, são necessários diferentes níveis de concentração para construir a curva analítica (no mínimo cinco). Além disso, o número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (BRASIL, 2020).

O limite de detecção de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. Um modo muito utilizado para calcular o limite de detecção é a relação sinal/ruído, determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos das amostras sem o analito, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança (BRASIL, 2020).

O limite de quantificação de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (EURACHEM, 2014). Também pode ser calculado pela relação sinal/ruído ou pode ser estimado a partir da curva analítica (curva de calibração) ou pelo desvio padrão de amostras brancas (BRASIL, 2020).

A precisão de um método pode ser expressa pela precisão intermediária, que se refere à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, no mesmo local e com medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um intervalo extenso de tempo, representando a variabilidade dos resultados em um laboratório (RIBANI *et al.*, 2004). O parâmetro de repetibilidade é essencial para obter estimativas confiáveis da precisão de um método. É a avaliação do mesmo procedimento de medição submetido a um conjunto de condições, como mesmos operadores, mesmo sistema de medição, mesmas condições de operação e mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (EUROPEAN COMMISSION, 2021). Os experimentos envolvendo análises repetidas devem ser projetados para levar em consideração todas as variações nas condições operacionais que podem ser esperadas durante o uso rotineiro do método, podendo ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a uma amostra branca, em várias concentrações na faixa de trabalho (RIBANI *et al.*, 2004).

O parâmetro de recuperação é o rendimento total de um processo analítico para um analito específico, dividido pela quantidade de analito na amostra original, expressa em porcentagem. A recuperação pode ser estimada pela análise de amostras brancas fortificadas com quantidades conhecidas (*spike*). A exatidão do protocolo verifica o grau de concordância entre os resultados de um ensaio e o verdadeiro valor de referência conhecido. Para avaliação da recuperação, as amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método (BRASIL, 2020).

A incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado da medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos ao mensurando, com base nas informações utilizadas. Esse parâmetro pode ser estimado pela soma ponderada das incertezas individuais geradas pela interpolação dos sinais analíticos no modelo de calibração e efeitos aleatórios dos instrumentos e do método analítico gerados pelos dados experimentais de precisão e recuperação (EURACHEM, 2014).

Quando a técnica MS é utilizada, a avaliação do efeito de matriz de um método analítico é importante pois esse efeito pode provocar supressão ou intensificação de sinal analítico. Esse fenômeno é um efeito combinado de todos os componentes da amostra, exceto do analito, na medição de sua quantidade. Esse fenômeno pode ter origem química e física. Este parâmetro pode ser avaliado com curvas analíticas preparadas com solvente e em matriz, antes e depois da extração. O efeito da matriz então é avaliado comparando-se as derivadas das linhas

obtidas das funções lineares que relacionam a concentração do analito e ou sinal analítico (HOFF, 2015).

1.7 CONCLUSÃO

O leite é um dos produtos mais consumidos em todo o mundo e a incidência do aumento de consumo de produtos lácteos frescos também aumentará na próxima década. O aumento da renda per capita e do crescimento populacional em escala mundial são fatores relacionados com o grande crescimento de demanda desses produtos. Dentre os inúmeros tipos de produtos lácteos fabricados no mundo, os queijos brancos (ou queijos frescos) estão entre os mais populares, devido à simplicidade do seu processamento. Por serem processados em grandes quantidades nos mais diversos países do mundo, são passíveis de serem objetos de práticas comerciais enganosas. A importância de se dispor de métodos analíticos que permitam a caracterização de produtos lácteos onde práticas comerciais fraudulentas possam ocorrer é cada vez mais requisitada. Métodos analíticos possuem grande utilidade no apoio às autoridades reguladoras na prevenção de fraudes em produtos alimentícios, e contribui para a proteção de consumidores e fabricantes de alimentos que atuam em conformidade com a normas vigentes.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação brasileira de normas técnicas. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. Rio de Janeiro, 2017.
- ANDERSON, Leigh *et al.* Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 573-588, 2006.
- ANEMA, Skelte G. The whey proteins in milk: Thermal denaturation, physical interactions, and effects on the functional properties of milk. **Milk proteins**, p. 325-384, 2020.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis**. Washington, 2002.
- ARAUJO, Pedro. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.
- AUGUSTIN, Mary A. *et al.* Influence of processing on functionality of milk and dairy proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 53, p. 1-38, 2007
- BARRETO, Abel *et al.* Determination of starch content in adulterated fresh cheese using hyperspectral imaging. **Food Bioscience**, v. 21, p. 14-19, 2018.
- BAUMAN, Dale E. *et al.* Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, 2006.
- BHAT, Zuhaib F. *et al.* Processing technologies for improved digestibility of milk proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 1-16, 2021.
- BOLAND, Mike. Whey proteins. **In: Handbook of food proteins**. Woodhead Publishing, 2011. p. 30-55.
- BRASIL**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº. 146, de 07 de março de 1996 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 1996.
- BRASIL**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006. Regulamenta os artigos 27-A, 28-A e 29-A da Lei n 8.171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, e da outra providencias. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2006.
- BRASIL**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 nº 5.741. Determina a publicação do: Guia de critérios para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2017.

BRASIL. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. (2020).

CAMERINI, Serena *et al.* Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in water buffalo, sheep, or goat Italian ricotta cheese. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1240-1248, 2016.

CAPELO, José. L. *et al.* Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques. **Analytical Chemical Acta**, v. 650, n. 2, p. 151-159, 2009.

CHANDRAN, Saravanan. *et al.* Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 4-14, 2007.

CHIARADIA, Mariza C. *et al.* O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COLLINS, Carol H. *et al.* **Fundamentos de Cromatografia**. Unicamp, Campinas, 2006.

DESIERE, Frank *et al.* The peptideatlas project. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. suppl_1, p. D655-D658, 2006.

DEWETTINCK, Koen. *et al.* Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 436-457, 2008.

DI STEFANO, Vita *et al.* Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74-85, 2012.

DOMON, Bruno *et al.* Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Queijo Minas Frescal**. Brasília, 2005.

EURACHEM GUIDE (2014). **The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2 ed. ISBN 978-91-87461-59-0.

EUROPEAN COMMISSION (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the Performance of Analytical Methods for Residues of Pharmacologically Active Substances Used in Food-Producing Animals and on the Interpretation of Results as Well as on the Methods to Be Used for Sampling and Repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. **Official Journal of the European Union**.

FARRELL JR, Harold *et al.* Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.

FAO. Organização das Nações Unidas. **Infográficos; Fatos sobre o leite**. Roma, Itália, 2019. Acesso realizado: 26 de setembro de 2021, disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/>>

FAO. Organização das Nações Unidas. **Portal para produção e produtos lácteos**. Roma, Itália, 2020. Acesso realizado: 26 de setembro de 2021, disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/processing/en/>>

FAO. "**OECD-FAO Agricultural Outlook (Edition 2021)**", OECD Agriculture Statistics (banco de dados). OECD Publishing, Paris / Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2021. Acessado realizado: em 18 de setembro de 2021, disponível em: <<dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>>

FENN, John B. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

GAUR, Vikas *et al.* Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 92-102, 2018.

GIACOMETTI, Jasminka *et al.* Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. **Food Chemistry**, v. 230, p. 91-98, 2017.

GROSS, Jürgen H. **Mass spectrometry: a textbook**. Springer Science & Business Media, 2006.

HAO, Xingkai *et al.* Quantification of major milk proteins using ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and its application in milk authenticity analysis. **Food Control**, v. 131, p. 108455, 2022.

HOFF, Rodrigo B. *et al.* Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015.

HORNE, David S. Casein micelle structure and stability. **In: Milk proteins**. Academic Press, p. 213-250, 2020.

HUSTOFT, Hanne K. *et al.* A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics. **Integrative Proteomics**, v. 73, 2012.

ISO, I. O. for S. (2005). ISO - ISO 13875:2005 - Liquid milk - Determination of acid-soluble β -lactoglobulin content - Reverse-phase HPLC method.

IUPAC. Compendium of chemical terminology (IUPAC Gold Book). 2011.

KEIL, Borivoj. **Specificity of proteolysis**. Springer Science & Business Media, 2012.

KHAN, Imran T. *et al.* Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. **Lipids Health Dis**, v. 18, n. 1, p. 41, 2019.

KHAN, Mati U. *et al.* Whey allergens: Influence of nonthermal processing treatments and their detection methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 5, p. 4480-4510, 2021.

KONTOPIDIS, George. *et al.* Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 785-796, 2004.

KRUBE, Anneli *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytical Chemical Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

LAGRANGE, Veronique *et al.* Global market for dairy proteins. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A16-A22, 2015.

LANÇAS, Fernando M. *et al.* A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANGE, Vinzenz *et al.* Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 222, 2008.

LE, Thao T. *et al.* Analytical methods for measuring or detecting whey proteins. **In: Whey proteins**. Academic Press, 2019. p. 155-184.

MAGENIS, Renata B. *et al.* A control method to inspect the compositional authenticity of Minas Frescal cheese by gel electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8333-8339, 2014 b.

MANSO, Mariá. A. *et al.* Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 845-855, 2005.

MASCI, Maurizio *et al.* Authenticity assessment of dairy products by Capillary Electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 43, n. 1-2, p. 340-354, 2022.

MALLICK, Parag *et al.* Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 125-131, 2007.

MEYER, Veronika R. **Practical high-performance liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2013.

MONTGOMERY, Holly *et al.* Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015–2019). **Global Food Security**, v. 26, p. 100447, 2020.

MURRAY, Kermit K. *et al.* Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 1515-1609, 2013.

NAGPAL, R. *et al.* Milk, milk products, and disease free health: an updated overview. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 321-333, 2012.

O'FARRELL, Patrick H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

ORTEA, Ignacio *et al.* Review on proteomics for food authentication. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 212-225, 2016.

PERRY, Katia S. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGANO, Francesca *et al.* High-performance liquid chromatography combined with electron ionization mass spectrometry: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 112-122, 2019.

RIISPOA. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 9.069, de 31 de maio de 2017 que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2017.

ROGATSKY, Eduard *et al.* Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 11, p. 1757-1759, 2005.

SATO, Kei *et al.* Espectrometria de massas em geologia isotópica. **Geologia USP. Série Científica**, v. 2, p. 57-77, 2002.

SCHNEIDER, Michel *et al.* The UniProtKB/Swiss-Prot knowledgebase and its plant proteome annotation program. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 567-573, 2009.

SPINK, John *et al.* Defining the public health threat of food fraud. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. R157-R163, 2011.

THOMPSON, Michael *et al.* Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

VALCÁRCEL, Miguel *et al.*, **Metrology of qualitative chemical analysis**, report EUR 20605 EN, European Commission, ISBN 92-894-5194-7. 2002.

VAN DEN OEVER, Sabrina P.; MAYER, Helmut K. Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, p. 105097, 2021.

VARGAS-BELLO-PÉREZ, Einar *et al.* Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 2, p. 136-144, 2019.

VERMA, Aparna *et al.* Challenges and opportunities of bovine milk analysis by mass spectrometry. **Clinical proteomics**, v. 13, n. 1, p. 8, 2016.

WILKINS, Marc R. *et al.* Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS—a World-Wide- Web- accessible tool. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3- 4, p. 403-408, 1997.

YU, Li-Rong *et al.* Proteomics: the deciphering of the functional genome. **In: Essentials of Genomic and Personalized Medicine.** Academic Press, 2010. p. 89-96.

CAPÍTULO 2

Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey*

*Artigo publicado na Revista Food Research International.

OLIVEIRA, L. V. A.; KLEEMANN, C. R.; MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; HOFF, R. B.; PRUDENCIO, E. S. **Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey.** Food Research International, 156, 111140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111140>.

ABSTRACT

This study evaluated the potential of a reference method to detect fresh cheeses adulteration with whey by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). Qualitative results were expressed as presence or absence of the marker peptide *TPEVDDEALEK*, obtained by tryptic hydrolysis of β -lactoglobulin. Sample preparation was based on defatting with cold acetone and protein solubilization in ammonium bicarbonate and urea buffer (pH = 8.0). Reversed phase liquid chromatography used a C_{18} column for separation of the analyte, whose retention time was 4.12 min. Mass spectrometry was carried out with positive electrospray ionization (ESI⁺) in multiple reaction monitoring (MRM) mode for the precursor ion (m/z 624) and the quantitation (m/z 573) and confirmation transitions (m/z 820; m/z 920) of the peptide. Method validation was carried out in quantitative terms, to set the baseline concentration of the marker peptide in 69 authentic samples, and in qualitative terms, to set the action level that distinguish authentic from adulterated cheeses (350 mg kg⁻¹). Sensitivity was enough to detect cheeses with 10% adulteration and the detection limit was set to 21 mg kg⁻¹. The simple extraction procedure allowed high-throughput analysis of 33 real samples. Results were compared to SDS-PAGE electrophoresis, whose limitations for accurate quantitation were easily overcome by LC-MS/MS. The developed method ensured precision, accuracy, sensitivity, and specificity needed for the unequivocal detection of non-compliant cheeses made with cow or buffalo milk, without dealing with the highly toxic chemical species required for SDS-PAGE. This method can be extended in the future to detect similar adulterations in fresh cheeses prepared with milk from other animal species, as well as in other dairy products.

Keywords: β -lactoglobulin; chromatography; dairy products; food analysis; food authenticity; proteomics.

1 INTRODUCTION

Fresh cheeses are usually processed in large batches that can be subject to economically motivated adulterations. White cheeses like Minas Frescal, a typical fresh cheese from Brazil, can be adulterated by replacing milk with whey during its processing (MAGENIS *et al.*, 2014a). Other adulterations can occur during fresh cheese making, such as mixing the curd with ricotta (a product of the thermal and acid denaturation of whey proteins). To detect such non-compliance, a qualitative method employing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) that used β -lactoglobulin (BLG) as adulteration marker was developed (MAGENIS *et al.*, 2014b). Since then, SDS-PAGE has been used to assist dairy control carried out by the Brazilian Federal Inspection Service. Notwithstanding, SDS-PAGE is a time-consuming technique that uses toxic reagents and has limitations for quantitative analysis.

BLG is the major whey protein that has two main genetic variants (A and B). Variant B is the reference protein with 162 amino acid residues and molecular weight of 18 kDa (Farrell *et al.*, 2004). BLG has several applications in food industry, such as monitoring and differentiating the ultra-high temperature (UHT) heat treatment of milk (GAUR *et al.*, 2018; ISO, 2005; VAN DEN OEVER *et al.*, 2021). When milk is submitted to UHT heating, BLG may aggregate with casein micelles, which causes its sedimentation during storage. On the other hand, when heating is below 70 °C, BLG does not undergo denaturation (ANEMA, 2020). BLG is also one of the main allergens in foodstuffs. Therefore, BLG has been the subject of many proteomic analytical methods (KHAN *et al.*, 2021; LUTTER *et al.*, 2011).

In many countries, the occurrence of economically motivated adulterations of dairy products has been a frequent issue for official inspection and has motivated the development of many proteomic methods for the detection and quantitation of marker peptides. One widely used approach is the shotgun, which identifies proteins based on their precursor peptides obtained by enzymatic hydrolysis. Several analytical techniques may be used to identify and quantify the peptides, as liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry mode (LC-MS/MS), liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time of flight tandem mass spectrometry (LC-QTOF-MS/MS), and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Due to their versatility, efficient chromatographic separation, sensitivity, and specificity, these techniques are very useful for dairy control, allowing the analysis of different marker peptides for the detection of milk adulteration with

whey by the caseinomacropeptide (CAMPOS MOTTA *et al.*, 2014), for the quantification of milk traces in foods (LUTTER *et al.*, 2011), for the detection of cow whey in buffalo, sheep, or goat ricotta (CAMERINI *et al.*, 2016), and for the detection of feta cheese adulteration with cow milk (KRITIKOU *et al.*, 2022).

Laboratories engaged in the detection of adulterations shall be encouraged to use state-of-the-art instrumentation. In Brazil, the official methods of the Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA) have proposed the use of LC-MS/MS and capillary electrophoresis for several applications (BRASIL, 2019). The objective of this work was to develop and validate a LC-MS/MS method to detect the adulteration of fresh cheeses with whey by a bottom-up/shotgun proteomic approach. The peptide *TPEVDDEALEK*, obtained by enzymatic digestion of BLG with trypsin, was used as adulteration marker. The method was aimed at providing qualitative results expressed as presence or absence of the marker peptide. Method applicability was checked by the analysis of 33 real samples, whose results were compared to the reference SDS-PAGE.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 REAGENTS, STANDARDS, AND SOLUTIONS

β -lactoglobulin (BLG) standard obtained from cow's milk (minimum purity of 90%), lyophilized trypsin obtained from swine pancreas (1.000-2.000 BAEE units mg^{-1}), ammonium bicarbonate (AMBIC, minimum purity of 99%), and urea (minimum purity of 99.5%) were supplied by Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, USA). Formic acid of analytical grade (minimum purity of 98%) was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Acetone of analytical grade was purchased from Lio Serum Produtos Laboratoriais e Hospitalares Ltda. (Ribeirão Preto, Brazil). Acetonitrile of chromatographic grade was supplied by J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, USA). Water was of ultrapure grade (minimum resistivity of 18.3 $\text{M}\Omega \text{ cm}$).

Urea and AMBIC solutions, as well the extraction buffer (pH = 8.0), were prepared as described by Lutter *et al.* (2011). Briefly, the extraction buffer was prepared by mixing equal parts of urea (1 mol L^{-1}) and ammonium bicarbonate (50 mmol L^{-1}). Trypsin was dissolved to 10 g L^{-1} in the extraction buffer. BLG stock solution was prepared by dissolving the solid standard to 10 g L^{-1} in the extraction buffer. BLG working solution was prepared at 8 g L^{-1} by digesting the stock solution with trypsin. Dilution solution for injection of the sample extracts

in the chromatograph was prepared by mixing water and acetonitrile in a 9:1 ratio and 0.1% of formic acid.

2.2 SAMPLES

An authentic cheese sample (negative control), processed on a pilot scale and 69 commercial samples of fresh cheeses, obtained from inspected factories, were used for method development and validation. Additionally, 33 commercial samples were used to compare the LC-MS/MS method to SDS-PAGE (described in detail in item 2.9). All cheese samples were homogenized in a food processor and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Pilot scale cheese making was in accordance to the Minas Frescal processing technique described by Dantas *et al.* (2016), with minor modifications. For this, pasteurized whole milk (4 L), bovine chymosin with 1:3000 coagulant power (Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda., Valinhos, Brazil), calcium chloride 40% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Duque de Caxias, Brazil), and lactic acid 85% (Purac Sínteses Indústria e Comércio Ltda., Campos dos Goytacazes, Brazil) were used. Milk was heated to $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a stainless-steel container. During heating, lactic acid (1 mL), calcium chloride (1.6 mL), and rennet (3.6 mL) were sequentially added. The mixture was stirred for 30 s after the addition of each ingredient. After heating, the mixture was kept in an oven at $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 40 min. The resulting curd was gently cut into cubes and gently agitated to increase the release of whey. Finally, the curd was placed in perforated cylindrical containers and stored for three days at $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Raw protein content was determined using the combustion method in a Dumatherm system (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Germany). Masses of 200 mg of cheese were subjected to pyrolysis in oxygen (minimum purity of 99.99%) at $1030\text{ }^{\circ}\text{C}$. The combustion products were oxidized with the aid of catalysts. After combustion, helium was used as a carrier gas for the volatile decomposition products. The molecular nitrogen of the resulting gas mixture was quantitated by thermal conductivity, using a mass gradient of EDTA for instrument calibration. Total protein was estimated by multiplying the nitrogen concentration by 6.38.

2.3 SELECTION OF THE ADULTERATION MARKER PEPTIDE

Initially, the candidate marker peptides were identified with the aid of the PeptideMass algorithm (WILKINS *et al.*, 1997) and the UniProtKB/Swiss-Prot repository (BOUTET *et al.*,

2016) for specific *Bos taurus* peptides. The following parameters were set: P02754 - LACB_BOVIN (UniProtKB protein identifier); trypsin (enzyme); no treatment for cysteines; all known post-translational modifications; peptides with masses smaller than 3000 Da. The identity of all candidate marker peptides experimentally obtained was confirmed by comparing their mass spectra with data displayed in the Peptide Atlas (DESIERE *et al.*, 2006). The candidate peptides were also analyzed in the Protein-BLAST database (SAYERS *et al.*, 2010) in terms of their selectivity and specificity. Finally, the selection of the adulteration marker peptide was based on its ability to differentiate a sample of authentic fresh cheese from a product made with whey. Mixtures of cheese and ricotta were prepared in the proportions of 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, and 80% (w/w, cheese/ricotta) to evaluate what was the minimum adulteration that could be detected by the analytical method.

2.4 EXTRACTION OF BLG

Cheese samples (50 mg) were weighed into 50 mL polypropylene centrifuge tubes. Samples were defatted with 5 mL of cold acetone (-20 ± 1 °C). The contents were stirred for 20 min at 180 rpm and then centrifuged for 10 min at 3600-g at 4 °C. The supernatant was discarded, and the acetone residue was removed by evaporation at room temperature. Then, 10 mL of extraction buffer was added to the protein precipitate contained in each tube. The mixture was stirred again for 20 min at 180 rpm. The tubes were then placed in an ultrasonic bath (60 kHz) for 40 min. Then, the tubes were centrifuged for 10 min at 3600-g at 4 °C and, at the resulting extracts were submitted to enzymatic digestion.

2.5 ENZYMATIC DIGESTION

Initially, the substrate/enzyme ratio requested for the digestion of BLG by trypsin was optimized. Four different substrate/enzyme ratios (5:1; 20:1; 50:1, and 100:1) were evaluated in triplicate. The BLG and trypsin solutions were mixed in polypropylene microtubes and placed in an oven at 37 ± 1 °C for 16 h. The optimal condition corresponded to the substrate/enzyme ratio that yielded the most intense chromatographic peaks of the peptides (item 2.6).

The efficiency of BLG cleavage by trypsin was then evaluated after 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 22, and 24 h. The experiment was carried out in triplicate. For this purpose, 100 μ L of BLG standard solution (10 g L^{-1}) and 20 μ L of trypsin (10 g L^{-1}) were added to polypropylene

microtubes and kept at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. After each interval, the samples were removed from the oven and $10 \mu\text{L}$ of formic acid were immediately added to each tube. Aliquots of the extracts were diluted in glass vials and injected into the LC-MS/MS system. The enzymatic efficiency was checked in hyperbolic transformation graphs where the areas of the chromatographic peaks of the peptides obtained at each digestion time were plotted. Peak areas were compared by the t-test (95% probability). The shortest digestion time from which there was no significant difference between peak areas was considered the most efficient.

The optimal digestion conditions were set to 5:1 (substrate/enzyme ratio) and 16 h at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Trypsin 10 g L^{-1} ($200 \mu\text{L}$) was added to the cheese extracts. The mixture was gently homogenized and kept at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 16 h. Thereafter, $50 \mu\text{L}$ of formic acid was added to each tube. Aliquots ($50 \mu\text{L}$) of the digested extracts were diluted with $950 \mu\text{L}$ of the dilution solution in glass vials and injected into the LC-MS/MS system.

2.6 LC-MS/MS ANALYSIS

LC-MS/MS analyzes were performed using the 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and the ExionLC (AB Sciex LLC, Framingham, USA) chromatographs coupled to QTRAP 5500 (AB Sciex LLC, Framingham, USA) mass spectrometers, with electrospray positive ionization source (ESI⁺) and multiple reaction monitoring (MRM) mode. Analyst and MultiQuant/Sciex OS software were used for system operation and data processing.

Reversed phase chromatography was performed on a C₁₈ Nucleodur Gravity (2.0 x 50 mm, 3 μm) column (Macherey-Nagel, Germany), equipped with a C₁₈ Security Guard (4.0 x 3.0 mm) guard column. Chromatographic optimization was performed for injection volume, mobile phase flow, column temperature, use of additives in mobile phases, and elution gradient. The optimal conditions were set to: 0.1% aqueous formic acid solution (mobile phase A); acetonitrile acidified with 0.1% formic acid (mobile phase B); elution gradient: 98% A (0 - 2 min), 60% A (2 - 5 min), 60% A (5 - 6 min), 35% A (6 - 7 min), 35% A (7 - 7.50 min), 0% A (7.50 - 8 min), 0% A (8 - 9 min), 98% A (9 - 9.2 min), 98% A (9.2 - 10 min), plus 2 min for system equilibration; 40°C (column temperature); flow: $300 \mu\text{L min}^{-1}$; and injection volume: $10 \mu\text{L}$.

The mass spectrometry parameters in MRM mode were optimized for the detection of precursor ions and their respective transitions produced by the fragmentation of marker

peptides. For this purpose, BLG was digested with trypsin (using the substrate/enzyme ratio of 5:1) and diluted to $100 \mu\text{g L}^{-1}$; the solution was filtered with a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane with $0.45 \mu\text{m}$ pores and infused in the mass spectrometer to optimize the ESI source in positive mode, under a continuous flow of $10 \mu\text{L min}^{-1}$. The ionization parameters were set to 5500 V (ion spray voltage), 20 psi (curtain gas), 50 psi (nebulizer gas), 45 psi (auxiliary gas), and $600 \text{ }^\circ\text{C}$ (source temperature). Nitrogen was used for nebulization and collision. For mass spectrometry analysis, the precursor ions of each peptide were selected with a resolution of one mass unit and the abundance of the respective transitions was evaluated by the signal/noise ratio. The most abundant transition was chosen for quantitation; confirmation was done with two other transitions. The following instrumental parameters were optimized for each analyte (Table 3): declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision cell potential (CXP), and collision energy (CE).

Table 3 – Optimized mass spectrometry parameters* for detection and quantitation of candidate adulteration marker peptides obtained by tryptic digestion of β -lactoglobulin.

Peptides	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Quantitation transition (m/z)	Confirmation transition (m/z)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)	CE (V)
<i>IIAEK</i> (C ₂₆ H ₄₈ N ₆ O ₈) [M+H] ⁺	4.22	574	248	- 199 227	211 211 211	10 10 10	14 12 14	27 43 37
<i>LIVTQTMK</i> (C ₄₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂ S) [M+2H] ²⁺	4.17	467	707	- 199 227	31 31 31	10 10 10	28 12 14	17 21 17
<i>VLVLDTDYK</i> (C ₄₉ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₆) [M+2H] ²⁺	4.45	533	853	- 754 966	86 86 86	10 10 10	14 12 44	19 21 19
<i>TPEVDDEALEK</i> (C ₅₂ H ₈₄ N ₁₂ O ₂₃) [M+2H] ²⁺	4.12	624	573	- 920 820	191 191 191	10 10 10	22 44 48	29 29 29
<i>VYVEELKPTPEGDLEILLQK</i> (C ₁₀₆ H ₁₇₁ N ₂₃ O ₃₄) [M+3H] ³⁺	4.86	772	1026	- 977 628	176 176 176	10 10 10	46 18 22	27 27 27

* DP = declustering potential; EP = entrance potential; CXP = collision cell exit potential; CE = collision energy.

2.7 ESTABLISHMENT OF THE ACTION LEVEL

The action level aimed to set the concentration of the marker peptide (threshold value) that differentiates an authentic cheese from an adulterated cheese. For this purpose, 69 authentic commercial samples were previously analyzed by SDS-PAGE (see item 2.9). Measurements of the marker peptide were then performed in triplicate ($n = 207$) by LC-MS/MS.

The normality of distribution was initially assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. A hypothesis discard test (Grubbs) was used before calculating the mean value and standard deviation of the mean concentrations of the marker peptide. All tests were performed with 95% probability. The action level was established based on the average concentration (mg kg^{-1}) of the marker peptide (X), plus ten times the average standard deviation (S), according to the equation 1:

$$\text{Action level (mg kg}^{-1}\text{)} = X + 10.S \quad (1)$$

2.8 METHOD VALIDATION

In-house validation of the LC-MS/MS method was carried out in terms of selectivity, working range, matrix effect, linearity, recovery, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ), according to Eurachem (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014) and Inmetro (BRASIL, 2020) guidelines.

2.8.1 Selectivity

Selectivity was assessed by LC-MS/MS analysis of twenty authentic cheese samples. The resulting chromatograms were evaluated for the presence of interfering peaks around the analyte retention time.

2.8.2 Matrix effect

The matrix effect was evaluated by analyzing two types of calibration curves. Solvent-prepared analytical curves used dilutions of the BLG in water and acetonitrile (9:1, v/v) with 0.1% of formic acid. Matrix-matched analytical curves were prepared by fortifying the digested extracts of authentic samples. The matrix effect was then assessed by comparing the derivatives

of the lines obtained from the linear functions that related analytic concentration (mg kg^{-1}) and analytical signal (peak area) by t-test.

2.8.3 Linearity

Linearity was evaluated by the reproducibility of regression coefficients (R^2) obtained from three analytical curves, whose R^2 should be greater than 0.99. Calibration curves were constructed at six levels (including zero), with three replicates per concentration point. A linear (unweighted) functional relationship of concentrations in mg kg^{-1} (x-axis) versus analytic peak areas (y-axis) was used.

2.8.4 Recovery and precision

Recovery and precision in terms of repeatability (S_r) and intermediate precision (S_{zi}) were determined in triplicate analysis of samples fortified with digested BLG standard in three different concentrations. The evaluation was carried out by two analysts, in two days of analysis. Recovery was considered satisfactory if the results were between 90 and 107%. For the precision study, the acceptance criterion was the coefficient of variation (CV).

2.8.5 False-positives and false-negatives rate

Qualitative precision was evaluated by the false-positive and false-negative result rates (equations 2 and 3), according to Eurachem guidelines (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). Blank and fortified blank samples at concentrations below, at, and above the action level were randomly coded. Blind LC-MS/MS analysis was carried out by two analysts, and then qualitative precision was assessed by calculating the rates of false positives/ false negatives as follows:

$$\% \text{ False positives} = \frac{\text{False positives}}{\text{Total known negatives}} \times 100 \quad (\text{Equation 2})$$

$$\% \text{ False negatives} = \frac{\text{False negatives}}{\text{Total known positives}} \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

2.8.6 Analytical limits

The detection (LOD) and quantitation (LOQ) limits were set in accordance with Inmetro guidelines (BRASIL, 2020). LOD and LOQ were calculated by the quotient of the standard deviations of the authentic cheeses (s) and the angular coefficients (a) of the analytical curves, according to equations 4 and 5, respectively:

$$LOD = 3.3 \frac{s}{a} \quad (\text{Equation 4})$$

$$LOQ = 10 \frac{s}{a} \quad (\text{Equation 5})$$

2.8.7 Expanded standard uncertainty

For the quantitative analytical approach, the measurement uncertainty was estimated by the weighted sum of the individual uncertainties yielded by the interpolation of the analytical signals in the calibration model and random effects of the instruments and the analytical method yielded by experimental data of precision and recovery. The expanded standard uncertainty was calculated by multiplying the combined standard uncertainty by the coverage coefficient k , based on a t-Student distribution (95%).

2.9 APPLICATION STUDY AND METHOD COMPARISON

After validation, the developed LC-MS/MS method was applied to 33 samples of fresh cheese, obtained from inspected establishments in Brazil. Samples of Minas Frescal, Chanclich, and Quark types, prepared by the conventional technique or by ultrafiltration with cow's or buffalo's milk, were analyzed. The results were compared to the SDS-PAGE method, performed as described by Magenis *et al.* (MAGENIS *et al.*, 2014b). Samples were diluted in sample buffer, shaken, and heated at 95 °C for 5 min. Aliquots of 5 µL of the sample were injected into the gel with 4% acrylamide/bisacrylamide. The concentration of acrylamide/bisacrylamide in the resolution gel was 15%. The gels were subjected to the constant potential difference of 200 V for 45 min in the Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Gels were stained with Coomassie blue for 16 h, destained with 40% ethanol and 10% acetic acid, and finally scanned in the Bio-Rad GS800 equipment for optical densitometry using the

Quantity One 1-D Analysis software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). The evaluation was performed by comparing the electrophoretic mobility and optical density of the BLG band in the samples. If the optical density was higher than the spiked sample, the result would be expressed as positive.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 PROTEIN CONTENT

The protein content of the cheeses ranged between 16 and 24 g 100 g⁻¹. Such variation may have been induced by the quality of the milk used as raw material. Milk composition is related to geographical origin, seasonality, environment, diet, animal breed and health, and stage of lactation. In addition, different cheese-making technologies (mainly heating temperature, coagulation pH, drainage, type of coagulant used, size, curd consistency, and salting method) can also influence the protein concentration (LUCAS *et al.*, 2006; LUCEY *et al.*, 2003). Thus, the use of samples from different sources was important to adequately represent this variation, since this method was developed to analyze one of the main milk proteins. The average crude protein concentration of the samples (20 g 100 g⁻¹) also helped to set the amount of trypsin necessary for adequate BLG cleavage.

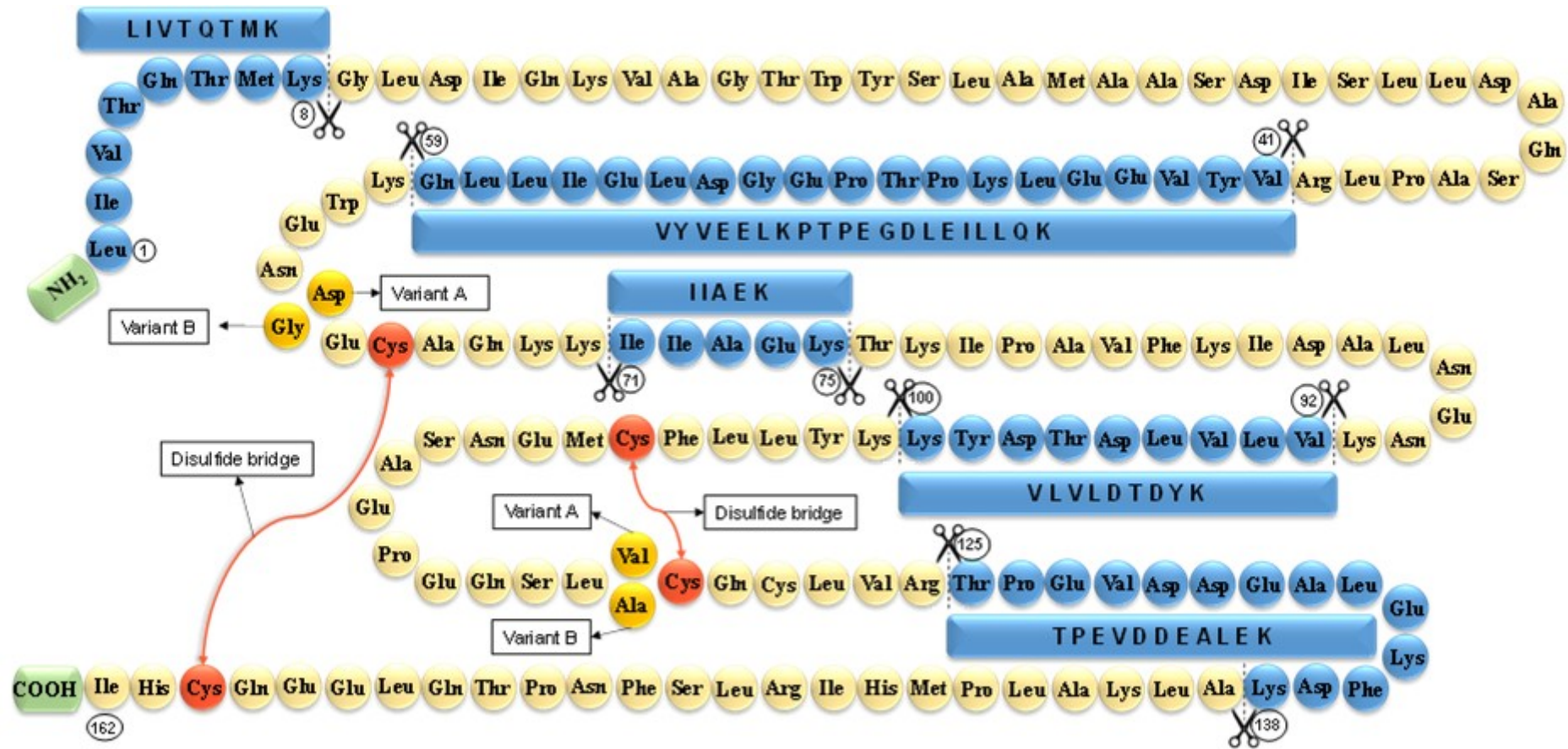
3.2 SELECTION OF THE ADULTERATION MARKER PEPTIDE

The theoretical tryptic digestion of bovine BLG yielded 13 peptides, from which five were considered as candidate markers (*IIAEK*, *LIVTQTMK*, *TPEVDDEALEK*, *VLVLDTDYK*, and *VYVEELKPTPEGDLEILLQK*) due to its analytical signal intensity and feasibility into the mass range able to be analyzed by tandem mass spectrometry. These peptides had from 5 to 25 amino acids residues (Figure 4).

All candidate peptides were originated from a region free of amino acids variations due to genetic variants A and B (amino acids 64 and 118, respectively) of BLG (FARRELL *et al.*, 2004). The peptides *IIAEK* and *VLVLDTDYK* are obtained by cleaving BLG from cow, buffalo, sheep, and goat milk. Notwithstanding, the analytical performance during quantitative method validation was not satisfactory for these peptides, which may have been caused by its instability, ineffective ionization, and dynamic modifications such as glycosylation and

phosphorylation (HAO *et al.*, 2022). On the other hand, the peptides *LIVTQTMK*, *TPEVDDEALEK*, and *VYVEELKPTPEGDLEILLQK* differ by one amino acid between such species. Thus, they were not suitable as adulteration markers for the analysis of cheeses made with sheep and goat milk. In the future, if the scope of the method needs to be extended to cheeses made with milk from these species, further studies need to be carried out. Regarding the peptide *TPEVDDEALEK*, it was suitable as an adulteration marker for cheeses made with cow or buffalo milk. This peptide was readily released from BLG by trypsin digestion and remained chemically stable during all other analytical procedures. Furthermore, when cheese adulteration was simulated in pilot-scale by mixing different proportions of cheese and ricotta, only the peptide *TPEVDDEALEK* was selective enough to distinguish samples with adulteration equal to or greater than 10%. This is an important, fit-for-purpose finding, since ricotta is considered a by-product by dairy regulation of many countries (CAMERINI *et al.*, 2016). The fraudulent addition of ricotta to the fresh cheese curd is a partial replacement of a higher value matrix with a cheaper one. Thus, the peptide *TPEVDDEALEK*, with the molecular mass of $1245.58 \text{ g mol}^{-1}$, was selected as a marker of adulteration, considering its discriminating and unambiguous profile for the analytical purpose. The peptide was monitored in the doubly charged ion form as m/z 624 $[M+2H]^{2+}$.

Figure 4 – Amino acids chain of bovine β-lactoglobulin, with the cleavage sites and the candidate peptides obtained by tryptic digestion.



3.3 BLG EXTRACTION AND ENZYMATIC DIGESTION

For complex matrices such as foodstuffs, sample preparation is the most important step in method development intended for protein analysis. One of the main advantages of this method was the simplicity of the extraction protocol, which required only three easy-to-apply steps: sample defatting, protein solubilization, and enzymatic digestion. The fat removal with cold acetone improved method selectivity, reducing the number of interfering peaks in the chromatograms. Defatting also facilitated enzymatic action at active sites during protein digestion, promoting their denaturation and precipitation. An alternative to acetone use is *n*-hexane (STELLA *et al.*, 2020). However, acetone has lower costs and is more environmentally friendly than *n*-hexane.

The use of AMBIC, a volatile protic solvent, increased the solubility, the dissociation, and the unfolding of the BLG, saturating the reaction medium and promoting protein precipitation by salting-out effect. The use of urea as a chaotropic agent also facilitated the access of trypsin to the active cleavage sites. The combination of AMBIC and urea, already well known in proteomics, was adequate to maintain the pH = 8.0 of the reaction medium favorable to BLG cleavage by trypsin (RICK, 1974).

Reducing and alkylating agents such as dithiothreitol (DTT) and iodoacetamide (IAA), respectively, have been used to reduce the intra- and intermolecular disulfide bridges between cysteine residues, leading to the formation of the more stable carbamidomethyl (HAO *et al.*, 2022; STELLA *et al.*, 2020). However, the sample preparation protocol developed in the current study did not require additional steps of reduction and alkylation additional neither cleanup nor concentration steps. The centrifugation step before the enzymatic digestion was able to satisfactorily remove the insoluble residues, decreasing the costs with solvents and reagents as well as the time required for the execution of the analytical protocol.

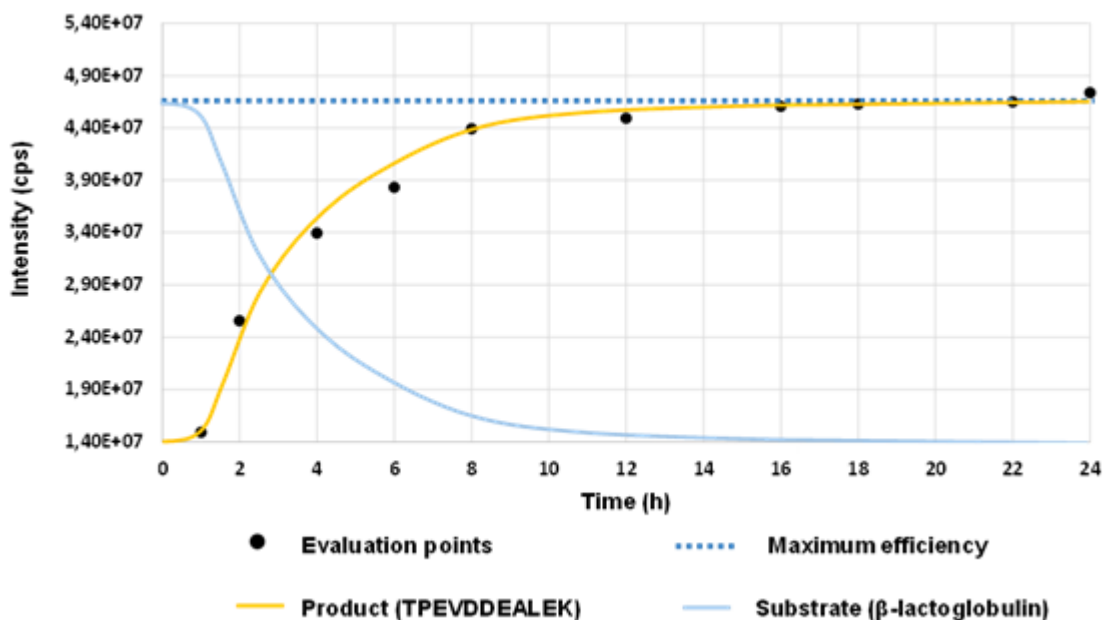
For a substrate/enzyme ratio of 5:1, the analytical signals observed for the peptides *IIAEK* and *TPEVDDEALEK* were more intense. For other evaluated enzyme/substrate ratios, the analytical response for the peptides *VLVLDTDYK* and *VYVEELKPTPEGDLEILLQK* was equally intense. However, these peptides have shown intense signal suppression when the substrate/enzyme ratio of 5:1 was used. We hypothesize that this suppression could have been caused by the high level of trypsin and co-elution of trypsin autolysis products (LAI *et al.*, 2015). Thus, these peptides were not considered suitable for the method purpose, due to the wide variation of their analytical signals, leading to non-conclusive results when real samples

were analyzed. The chosen substrate/enzyme ratio assured the best digestion yield at 37 °C, which is considered the optimum temperature for protein cleavage by trypsin (RICK, 1974). In conclusion, the substrate/enzyme ratio was set to 5:1 and was used for all subsequent experiments.

When trypsin is used for protein cleavage, a minimum time of 9 h is required for digestion (PROC *et al.*, 2010). This behavior was confirmed by the present study since the analytical signal of the *TPEVDDEALEK* peptide increased after 8 h of digestion (Figure 5). The analytical signal continued to increase significantly until 16 h of digestion ($p < 0.05$). Beyond this period, a plateau was observed, due to the complete enzymatic cleavage of the substrate. The digestion time was set to 16 h, allowing the digestion process to be carried out overnight, a usual procedure in proteomics (HUSTOFT *et al.*, 2012).

Although simple, the shotgun proteomic protocol validated in this method is well established in the scientific literature, where AMBIC and urea have been often used at the same concentrations (LUTTER *et al.*, 2011). The peptide *TPEVDDEALEK* has also been used as a marker of BLG to quantify several allergens in food matrices by LC-MS/MS, with sample preparation steps such as extraction and tryptic digestion that agreed with the conditions evaluated in the current study (LUTTER *et al.*, 2011; STELLA *et al.*, 2020). On the other hand, some protocols include heating the extracts (at temperatures between 50 and 60 °C) or use a higher substrate/enzyme ratio, to improve protein solubilization (due to the consequent structural modification) or to obtain different marker peptides when several analytes need to be analyzed simultaneously (CAMERINI *et al.*, 2016; HAO *et al.*, 2022; LUTTER *et al.*, 2011).

Figure 5 – Efficiency evaluation of the enzymatic digestion of β -lactoglobulin (BLG) using trypsin for the production of the peptide *TPEVDDEALEK* and liquid chromatography coupled to mass spectrometry for its detection and quantitation.

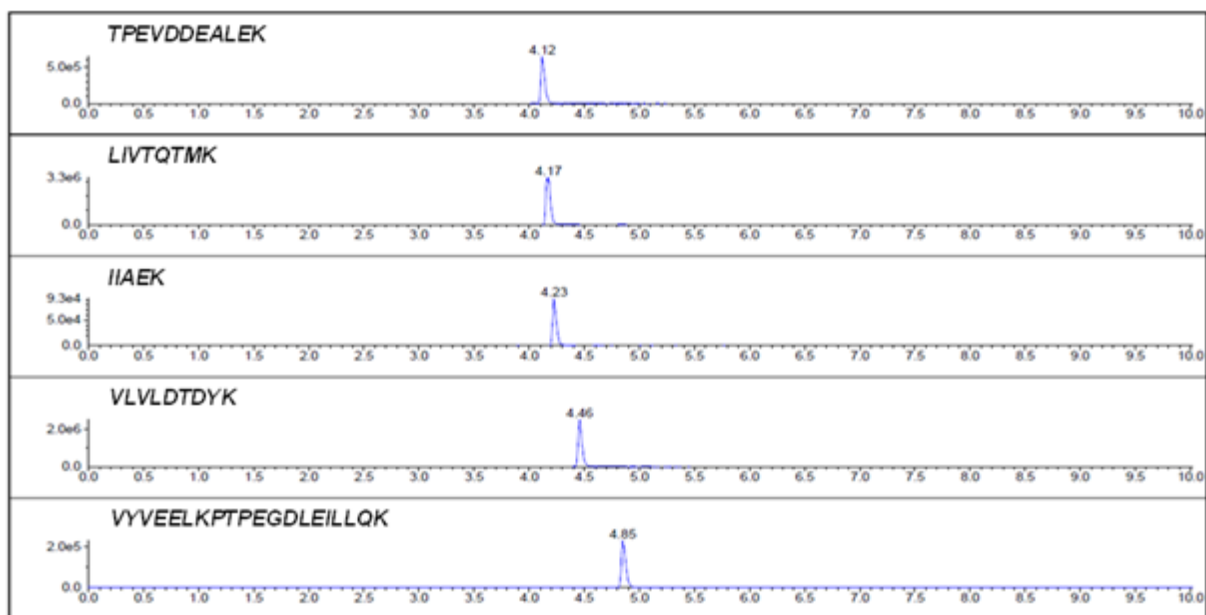


3.4 LC-MS/MS ANALYSIS

The mass resolution and abundance criteria were accomplished for the selected peptide (*TPEVDDEALEK*, m/z 624). Both quantitative (m/z 573) and confirmatory ions (m/z 920; m/z 820) met the signal-to-noise ratio above 3:1 to mass spectrometry detection (EUROPEAN COMMISSION, 2021).

Before the chromatographic method validation, several stationary phases were evaluated (phenyl, cyano, C₄, C₈, and C₁₈) regarding the chromatographic peaks intensity and resolution, as well as the retention time. This evaluation was made for all candidate marker peptides. The best results were obtained with the C₁₈ phase, which was very convenient due to the easy availability of this column. When using liquid chromatography, the post-translational changes induced by heat treatment of dairy products, such as the non-enzymatic lactosylation of the lysine residues of BLG, can cause variations in the chromatograms, making it difficult to analyze and tryptic peptides in some types of products (FEINBERG *et al.*, 2006; ANDERSSON *et al.*, 2021). This was not the case of the present study, which obtained well-resolved peaks in a short separation time (less than 5 min) (Figure 6).

Figure 6 – Extracted ion chromatograms for the quantitative m/z transitions of the five candidate marker peptides of BLG, yielded by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.



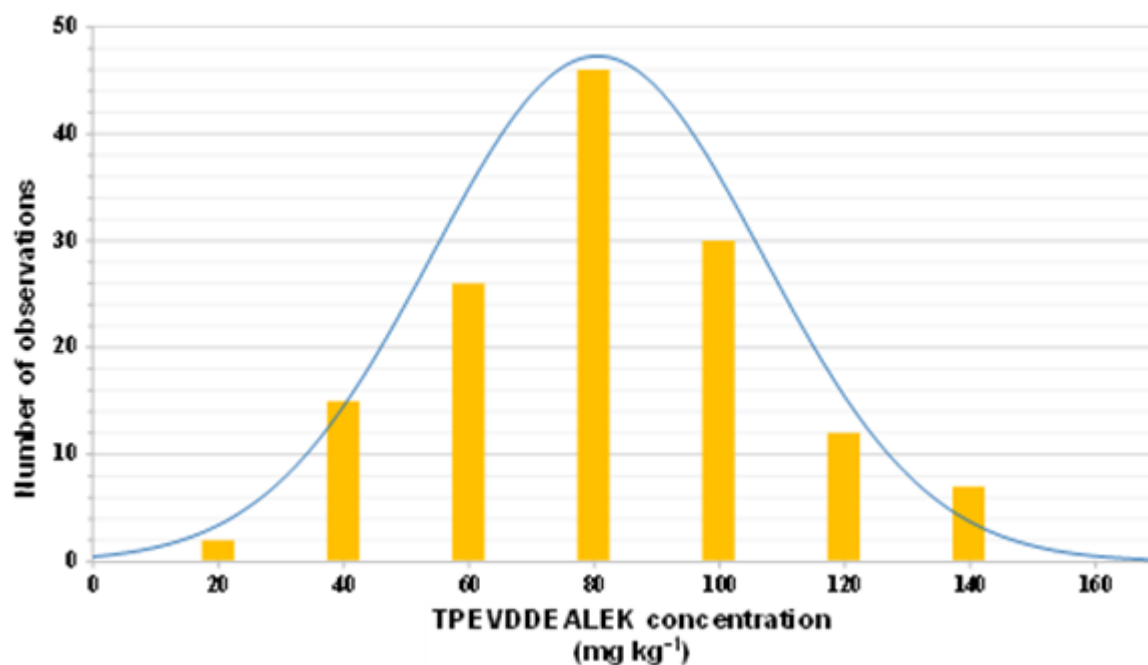
3.5 ESTABLISHMENT OF THE ACTION LEVEL

The establishment of the action level was aimed at estimating the endogenous concentration of the marker peptide in 69 authentic cheese samples. Thus, authentic samples could safely be distinguished from adulterated ones by a cut-off value (action level). Our LC-MS/MS method was developed to provide qualitative results that were expressed as presence or absence of the adulteration marker peptide. However, the MRM mode also allowed quantitative analysis with adequate selectivity and accuracy. Many times, in control activities of regulatory issues, an estimate of the fraud extension may be requested by the court (CAMERINI *et al.*, 2016). This achievement was possible because there is a well-defined quantitative relationship between milk proteins and their corresponding trypsin-digested marker peptides (HAO *et al.*, 2022). BLG concentration in cow's milk may vary among 2 and 4 g L⁻¹ (FARRELL *et al.*, 2004). In heat-treated milk, it may vary from 1.0 to 2.6 g L⁻¹, depending on the heat treatment (LAN *et al.*, 2010). The theoretical concentration of the marker peptide *TPEVDDEALEK* (C₅₂H₈₄N₁₂O₂₃, 1245.58 g mol⁻¹) in a Minas Frescal cheese can be estimated based on the tabulated raw protein value (17.4 g 100 g⁻¹) from *TACO* – Brazilian Table of Food Composition (NEPA-UNICAMP, 2011). Considering the average concentration of BLG in

cow's milk as $3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, authentic Minas Frescal cheeses might have about 350 mg kg^{-1} of the marker peptide. For this calculation, the molar mass of the genetic variant B was considered, which is the reference protein expressed by cow, buffalo, sheep, and goat species (FARRELL *et al.*, 2004; CAMERINI *et al.*, 2016). The concentration of BLG in cheese samples can be estimated by multiplying the amount of the peptide *TPEVDDEALEK* by 14.68 (molecular weights ratio). Therefore, the established level of action corresponded, in terms of BLG in the fresh cheese samples, to approximately 5 g kg^{-1} .

The LC-MS/MS measurements of the endogenous concentrations of the marker peptide (obtained in triplicate analysis) had normal distribution (Figure 7), allowing the calculation of the action level of the analytical method by equation 1. Such thresholding approach was also possible because the contents of major milk proteins vary within a small range (HAO *et al.*, 2022). The action level was then set to 350 mg kg^{-1} , which agrees with the theoretical endogenous concentration of the marker peptide *TPEVDDEALEK*. The established action level demonstrated the method's fitness for the purpose and suitability of the linear working range (175 to $2,800 \text{ mg kg}^{-1}$) defined for analytical validation. The qualitative method was then designed to provide binary results (positive or negative) by comparing the peak areas of the marker peptide of a test sample to a blank sample spiked in the threshold concentration (action level). If the peak area is higher than in the spiked sample, test sample should be considered positive (non-compliant), and whey must have been used in replacement of milk. On the other hand, if the peak area of the marker peptide is lower than the threshold, the sample is considered to be negative (compliant), and cheese-making is presumed to have been properly done.

Figure 7 – Distribution histogram of measurements ($n = 207$) of basal concentrations of the peptide *TPEVDDEALEK* in samples of authentic cheeses, yielded by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.



3.6 ANALYTICAL VALIDATION

The LC-MS/MS method used to determine the marker peptide *TPEVDDEALEK* had a satisfactory performance during the quantitative and qualitative validation. The selectivity was adequate, as there were no interfering peaks around the analyte retention time (Figure 8). The matrix effect was evidenced with a significant difference in the slopes of the calibration curves prepared in solvent and matrix. Thus, matrix-matched analytical curves were used for all measurements. This calibration model provided satisfactory linearity to the method since all regression coefficients of the analytical curves were greater than 0.99. Low coefficients of variation (CV) were obtained for repeatability ($CV \leq 9\%$) and intermediate precision ($CV \leq 12\%$). The accuracy was also adequate with an average recovery between 98 and 102%. The precision in qualitative terms was also satisfactory, since all groups of samples were successfully identified by the analysts, with no false-positive or false-negative results.

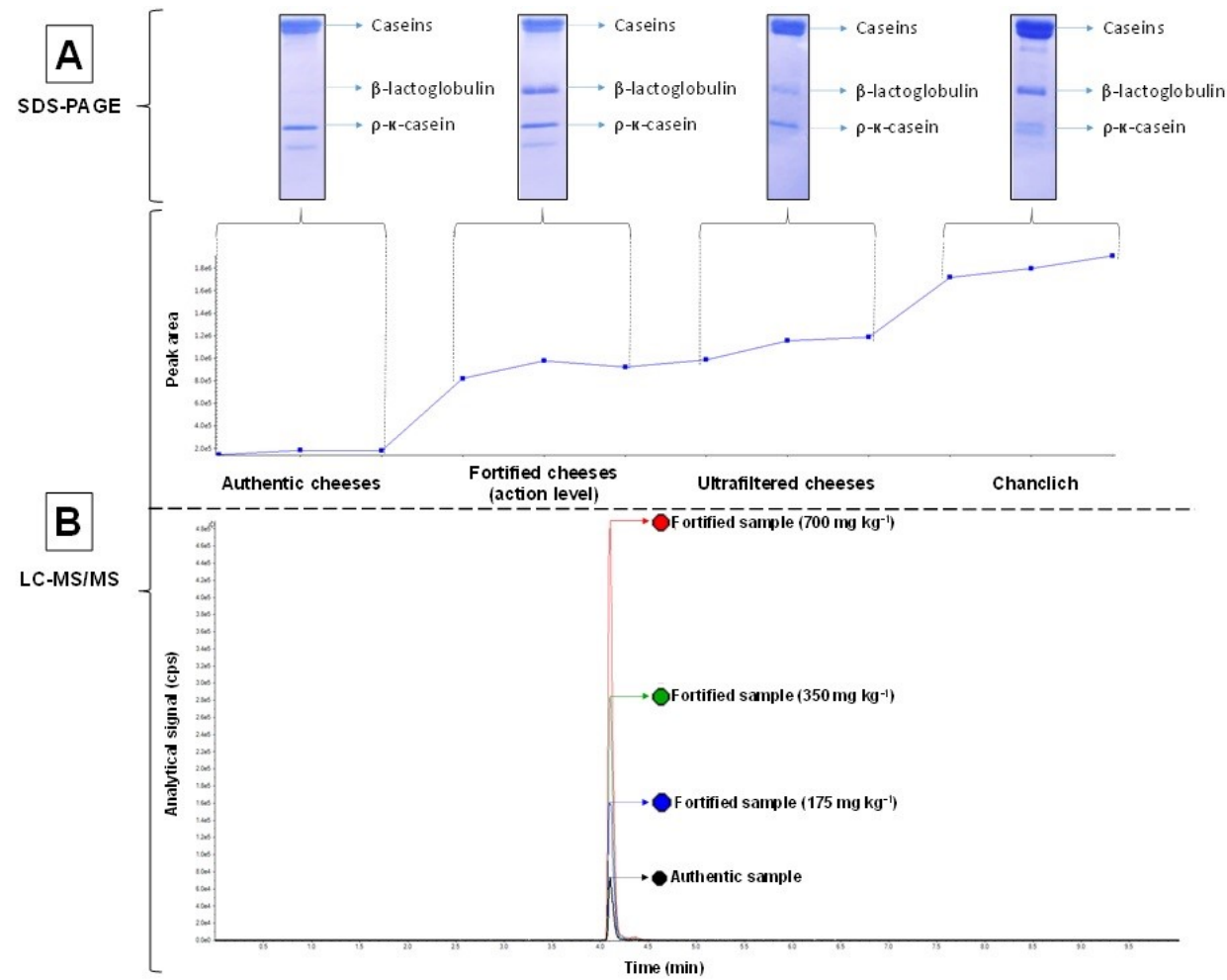
The analytical limits of the marker peptide were set to 21 mg kg⁻¹ (limit of detection) and 63 mg kg⁻¹ (limit of quantitation). Although the established limits confirm the suitability of the developed method for our purpose, the decision-making regarding the non-compliance of

samples analyzed by LC-MS/MS is based on the action level (threshold value), similarly to the criterion adopted by Magenis *et al.* (MAGENIS *et al.*, 2014b) for the SDS-PAGE method (Figure 8, part B).

Due to the limitation of the SDS-PAGE technique for quantitation, the detection limit and action level established by electrophoresis were much higher (7 mg g^{-1} and 14 mg g^{-1} , respectively). Thus, in addition, to be the first assay to use LC-MS/MS to detect adulteration of white cheeses with whey proteins, this method allowed unequivocal decision making, with increased sensitivity in comparison to SDS-PAGE.

The expanded standard uncertainty was set to 79 mg kg^{-1} . The largest sources of contribution to the uncertainty were related to the overall precision and the interpolation of analytical signals in the analytical curve. The bias was negligible in the evaluated analyte range. The relative expanded uncertainty was set to 22%, which was lower than other applications for peptide analysis in dairy products. Lutter *et al.* (2011) found relative expanded uncertainties that ranged among 69 and 274% for the analysis of the same marker peptide (*TPEVDDEALEK*) and BLG, even using internal standard peptides containing isotopically labeled amino acids. Therefore, the expanded standard uncertainty of the developed method was adequate for quantitative purposes.

Figure 8 – Part A: comparison of results yielded by LC-MS/MS and SDS-PAGE. Partial electropherograms and graphic plots. Part B: overlaid extracted ion LC-MS/MS chromatograms of the quantitative transition of the adulteration marker peptide in authentic and fortified cheese samples.



3.7 METHOD COMPARISON AND APPLICABILITY STUDY

All results of the method comparison agreed between the two techniques (LC-MS/MS and SDS-PAGE) for the 33 real samples. The incidence of non-compliant samples was much lower (9.1%) than the scenario previously reported by the SDS-PAGE method (MAGENIS *et al.*, 2014b). On the other hand, non-compliances were detected in other cheese samples, demonstrating that the exchange of raw material (milk versus whey) is not restricted to the processing of a specific type of cheese. The adulteration of fresh cheeses such as Minas Frescal, one of the main produced cheeses in Brazil, was first reported by our research group in 2014 when the prevalence of non-compliant samples was very high (43%) (MAGENIS *et al.*, 2014b). This high prevalence coincided with the initial period of implementation of the analytical method by SDS-PAGE in MAPA's laboratory. Official control then began to be performed more frequently, because a specific method to support dairy inspection was available.

Interestingly, the ultrafiltered cheeses, although negative in the analysis by SDS-PAGE, had positive results when analyzed by LC-MS/MS, since the analytical signal of the marker peptide was higher than the control sample signal, fortified at the action level (Figure 8, part A). Ultrafiltration traps the whey proteins in the casein network, producing matrix and quality characteristics different from cheeses made by the conventional process (SOLTANI *et al.*, 2022). Consequently, under the conditions validated for the LC-MS/MS method, it is not suitable for the analysis of ultrafiltered cheeses and complementary studies should be carried out to evaluate this specific matrix. Under the current conditions, ultrafiltered cheeses should rather be analyzed by SDS-PAGE.

4 CONCLUSION

The peptide *TPEVDDEALEK*, obtained by the tryptic digestion of BLG, was used as an adulteration marker of fresh cheeses prepared with cow's or buffalo's milk when the raw material (milk) was replaced by whey. The developed and validated LC-MS/MS method can replace the reference SDS-PAGE method with many advantages. Although it is a valuable technique for qualitative protein analysis, SDS-PAGE has limitations for accurate quantitation. These difficulties were easily overcome by LC-MS/MS, which ensured the precision, accuracy, sensitivity, and specificity needed for the unequivocal detection of non-compliant cheeses, without dealing with the highly toxic chemical species required for SDS-PAGE electrophoresis, such as acrylamide and 2-mercaptoethanol. The shotgun and bottom-up proteomics approach adopted in the LC-MS/MS method was simple and efficient to detect fresh cheeses adulterated with whey above 10%. This method has potential to detect adulteration of fresh cheeses processed with sheep or goat milk, provided that other marker peptides are selected, for which a new validation must be carried out. In addition, this method can be readily adapted to detect adulterations with whey in other dairy products, such as milk powder.

Acknowledgments

The authors are grateful to Vanessa Oliveira (UFSC) and Renata Bongiolo Magenis (IFC), for the clarification of several doubts and technical advisement during project development. Elane S. Prudencio is grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support (405965/2016-8).

REFERENCES

- ANDERSSON, Ida-Marie *et al.* Effects of feed composition, protein denaturation and storage of milk serum protein/lactose powders on lactosylation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, p. 480-492, 2021.
- ANEMA, Skelte G. The whey proteins in milk: Thermal denaturation, physical interactions, and effects on the functional properties of milk. **Milk Proteins**, p. 325-384, 2020.
- BRASIL**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. (2019).
- BRASIL**. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. (2020).
- BOUTET, Emmanuel *et al.* UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view. In: **Plant Bioinformatics**. Humana Press, New York, NY, p. 23-54, 2016.
- CAMERINI, Serena *et al.* Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in water buffalo, sheep, or goat Italian ricotta cheese. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1240-1248, 2016.
- CHEISON, Seronei C. *et al.* Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin: Analysis by LC-ESI-TOF/MS. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 457-467, 2010.
- MOTTA, TM Campos *et al.* Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 120, p. 498-505, 2014.
- DANTAS, Aline B. *et al.* Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 18-30, 2016.
- DESIERE, Frank *et al.* The peptideatlas project. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. suppl_1, p. D655-D658, 2006.
- EUROPEAN COMMISSION**. Official Journal of the European Union. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the Performance of Analytical Methods for Residues of Pharmacologically Active Substances Used in Food-Producing Animals and on the Interpretation of Results as Well as on the Methods to Be Used for Sampling and Repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. v. 180, p. 84-109, 2021.
- FARRELL JR, H. M. *et al.* Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.
- FEINBERG, Max *et al.* Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 188-194, 2006.
- GAUR, Vikas *et al.* Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 92-102, 2018.

HAO, Xingkai *et al.* Quantification of major milk proteins using ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and its application in milk authenticity analysis. **Food Control**, v. 131, p. 108455, 2022.

HUSTOFT, Hanne K. *et al.* A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics. **Integrative Proteomics**, v. 73, 2012.

ISO. ISO 13875:2005 - Liquid milk - Determination of acid-soluble β -lactoglobulin content - Reverse-phase HPLC method. (2005).

KHAN, Mati U. *et al.* Whey allergens: Influence of nonthermal processing treatments and their detection methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 5, p. 4480-4510, 2021.

KRITIKOU, Anastasia S. *et al.* MALDI-TOF-MS integrated workflow for food authenticity investigations: An untargeted protein-based approach for rapid detection of PDO feta cheese adulteration. **Food Chemistry**, v. 370, p. 131057, 2022.

LAI, Shiyun *et al.* A combined tryptic peptide and winged peptide internal standard approach for the determination of α -lactalbumin in dairy products by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 10, p. 1800-1806, 2015.

LAN, X. Y. *et al.* Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. C653-C658, 2010.

LUCAS, Anthony *et al.* Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. **Le Lait**, v. 86, n. 1, p. 21-41, 2006.

LUCEY, Jhon. A. *et al.* Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2725-2743, 2003.

LUTTER, Petra *et al.* Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 4, p. 1043-1059, 2011.

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

MAGENIS, Renata B. *et al.* A control method to inspect the compositional authenticity of minas frescal cheese by gel electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8333-8339, (2014b).

NEPA-UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - Quarta edição revista e ampliada**. (2011).

PROC, Jennifer L. *et al.* A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 10, p. 5422-5437, 2010.

RICK, W. **Trypsin**. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edition) (pp. 1013–1024). Academic Press. (1974).

SAYERS, Eric W. *et al.* Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_1, p. D38-D51, 2010.

SOLTANI, Mostafa. *et al.* Perspectives and recent innovations on white cheese produced by conventional methods or ultrafiltration technique. **International Dairy Journal**, v. 125, p. 105232, 2022.

STELLA, Roberto *et al.* LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127276, 2020.

VAN DEN OEVER, Sabrina P. *et al.* Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 121, p. 105097, 2021.

WILKINS, Marc R. *et al.* Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - a World - Wide - Web - accessible tool. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 403-408, 1997.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da abordagem proteômica *bottom-up* e *shotgun* por LC-MS/MS foi simples e demonstrou ser eficiente na capacidade de detectar e avaliar diferentes peptídeos obtidos pela digestão enzimática da BLG com tripsina. A tripsina por ser uma enzima com elevada seletividade de clivagem, conferiu reprodutibilidade à análise de identificação dos peptídeos.

Devido às altas concentrações da BLG em queijos frescos adulterados, o peptídeo *TPEVDDEALEK*, obtido por digestão enzimática da BLG pela tripsina, foi adequado para a detecção e quantificação de BLG por LC-MS/MS.

O método LC-MS/MS desenvolvido foi validado para avaliação da autenticidade de queijos frescos preparados com leite de vaca e búfala e apresentou resultados satisfatórios quanto aos parâmetros de validação e de aplicabilidade a amostras reais, quando comparado ao SDS-PAGE. A substituição de leite por soro de leite e a mistura de massas de queijo e ricota podem ser detectadas quando superiores a 10%.

Embora SDS-PAGE seja uma técnica grandiosa para análise qualitativa de proteínas, possui limitações para avaliações quantitativas. Essas limitações foram superadas pelo método LC-MS/MS, que garantiu a precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade necessárias para a detecção inequívoca do analito em amostras de queijos não conformes.

Este método descrito nesta dissertação (LC-MS/MS) será utilizado na avaliação da autenticidade de queijos frescos no serviço de fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como alternativa ao método SDS-PAGE.

A continuidade de novos estudos deve ser incentivada de maneira que, diferentes frentes de pesquisas relacionadas a outras possíveis adulterações de produtos lácteos, bem como a utilização de protocolos proteômicos na avaliação de diferentes tipos de não conformidade, sejam desenvolvidas e otimizadas. A exemplo disso, para a obtenção de outros marcadores da BLG novos estudos de especificidade devem ser realizados com o intuito otimização do processo de extração e digestão enzimática. Para aumentar o escopo do método abrangendo mais espécies de ruminantes é necessário realizar novos estudos para obtenção de peptídeos marcadores que possam contemplar todas as espécies de interesse.

ANEXO A – Artigo “Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey” publicado na revista Food Research International.



Reference LC-MS/MS method to detect fresh cheeses adulteration with whey

Luan Valdemiro Alves de Oliveira^{a,b}, Cristian Rafael Kleemann^{a,b,c}, Luciano Molognoni^{a,c}, Heitor Daguer^{a,*}, Rodrigo Barcellos Hoff^a, Elane Schwinden Prudencio^{b,*}

^a Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Seção Laboratorial Avançada em Santa Catarina, São José, SC, Brazil

^b Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Florianópolis, SC, Brazil

^c Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Beta-lactoglobulin
Chromatography
Dairy products
Food analysis
Food authenticity
Proteomic approach

ABSTRACT

This study evaluated the potential of a reference method to detect fresh cheeses adulteration with whey by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). Qualitative results were expressed as presence or absence of the marker peptide TPEVDDEALEK, obtained by tryptic hydrolysis of β -lactoglobulin. Sample preparation was based on defatting with cold acetone and protein solubilization in ammonium bicarbonate and urea buffer (pH = 8.0). Reversed phase liquid chromatography used a C₁₈ column for separation of the analyte, whose retention time was 4.12 min. Mass spectrometry was carried out with positive electrospray ionization (ESI⁺) in multiple reaction monitoring (MRM) mode for the precursor ion (m/z 624) and the quantitation (m/z 573) and confirmation transitions (m/z 820; m/z 920) of the peptide. Method validation was carried out in quantitative terms, to set the baseline concentration of the marker peptide in 69 authentic samples, and in qualitative terms, to set the action level that distinguish authentic from adulterated cheeses (350 mg kg⁻¹). Sensitivity was enough to detect cheeses with 10% adulteration and the detection limit was set to 21 mg kg⁻¹. The simple extraction procedure allowed high-throughput analysis of 33 real samples. Results were compared to SDS-PAGE electrophoresis, whose limitations for accurate quantitation were easily overcome by LC-MS/MS. The developed method ensured precision, accuracy, sensitivity, and specificity needed for the unequivocal detection of non-compliant cheeses made with cow or buffalo milk, without dealing with the highly toxic chemical species required for SDS-PAGE. This method can be extended in the future to detect similar adulterations in fresh cheeses prepared with milk from other animal species, as well as in other dairy products.

1. Introduction

Fresh cheeses are usually processed in large batches that can be subject to economically motivated adulterations. White cheeses like Minas Frescal, a typical fresh cheese from Brazil, can be adulterated by replacing milk with whey during its processing (Magenis, Prudencio, Fritzen-Freire, & Stephan, 2014). Other adulterations can occur during fresh cheese-making, such as mixing the curd with ricotta (a product of the thermal and acid denaturation of whey proteins). To detect such non-compliance, a qualitative method employing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) that used β -lactoglobulin (BLG) as adulteration marker was developed (Magenis, Prudencio, Molognoni, & Daguer, 2014). Since then, SDS-PAGE has been used to assist dairy control carried out by the Brazilian Federal Inspection Service. Notwithstanding, SDS-PAGE is a time-consuming

technique that uses toxic reagents and has limitations for quantitative analysis.

BLG is the major whey protein that has two main genetic variants (A and B). Variant B is the reference protein with 162 amino acid residues and molecular weight of 18 kDa (Farrell et al., 2004). BLG has several applications in food industry, such as monitoring and differentiating the ultra-high temperature (UHT) heat treatment of milk (Gaur, Schalk, & Anema, 2018; ISO, 2005; van den Oever & Mayer, 2021). When milk is submitted to UHT heating, BLG may aggregate with casein micelles, which causes its sedimentation during storage. On the other hand, when heating is below 70 °C, BLG does not undergo denaturation (Anema, 2020). BLG is also one of the main allergens in foodstuffs. Therefore, BLG has been the subject of many proteomic analytical methods (Khan et al., 2021; Lutter, Parisod, & Weymuth, 2011).

In many countries, the occurrence of economically motivated

* Corresponding authors.

E-mail addresses: heitor.daguer@agro.gov.br (H. Daguer), elane.prudencio@ufsc.br (E. Schwinden Prudencio).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111140>

Received 21 January 2022; Received in revised form 4 March 2022; Accepted 13 March 2022

Available online 16 March 2022

0963-9969/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.