

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE  
ADULTERAÇÃO DE LEITE BOVINO POR ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO POR  
CLAE-EM/EM.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mestranda: Tanara Magalhães Campos Motta

Orientador: Prof.<sup>a</sup>: Dra. Tânia Mara Pizzolato

Porto Alegre, março de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TANARA MAGALHÃES CAMPOS MOTTA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a

obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Orientadora (UFRGS)

Porto Alegre, março de 2013.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março/2011 e janeiro/2013, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Tânia Mara Pizzolato. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. João Henrique Zimonoch dos Santos  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Charley Christian Staats  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul

Orientadora Profa Dra Tânia Mara Pizzolato  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim por seguir em frente ultrapassando obstáculos e realizando sonhos. A UFRGS pelo ensino de qualidade e pela oportunidade.

À Professora Doutora Tânia pela orientação, compreensão, por todo o aprendizado a mim proporcionado e, por ser essa mulher fantástica.

Ao Rodrigo Hoff pela oportunidade e principalmente pelo aprendizado, seja na vida, seja no trabalho.

Aos colegas do LANAGRO/RS, Setor RPM, em especial, Fabiano Barreto, Cristina Ribeiro, Jéssica Mello, Tiago Feijó, Daniel Lorenzini, Leonardo Meneghini, Marcos Colombo, Juliana Arsand, Magda Martins e Louíse Jank.

Aos colegas do LANAGRO/RS, Setor de Microbiologia e Físico-Químico pelo apoio técnico, em especial Julia Malmann e Rita Andrade.

Ao meu amor Demián pela companhia maravilhosa, por todo carinho e por me dar o melhor presente em 2012, nosso filhote Benício.

A minha família, em especial a minha mãe e meu pai pela compreensão e incentivo.

Aos meus bichinhos de estimação pelo afeto e por estarem ao meu lado até na hora dos estudos. Aos professores e funcionários do Instituto de química.

Ao Instituto Euvaldo Lodi pelo apoio financeiro através do projeto RENALI/SIBRATEC.

## SUMÁRIO

Índice de anexos.....	viii
Índice de tabelas.....	ix
Índice de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	4
2.1 Objetivos gerais.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3 Revisão Bibliográfica.....	5
3.1 Composição e qualidade do leite.....	5
3.1.1 Legislação e características físico-químicas do leite.....	5
3.1.2 Composição do leite.....	5
3.1.3 Proteínas do leite.....	6
3.2 Fraudes por adição de soro de queijo.....	8
3.2.1 Processo de produção de queijo.....	8
3.2.2 Proteólise bacteriana.....	9
3.2.3 Legislação para controle de leite e produtos lácteos.....	11
3.2.3.1 Instrução Normativa Nº 68, 12 de dezembro de 2006 (IN 68, MAPA).....	11
3.2.3.2 Instrução Normativa Nº 69, 13 de dezembro de 2006 (IN 69, MAPA).....	11
3.2.3.3 Instrução Normativa Nº 07, 10 de março de 2010 (IN 07, MAPA).....	12
3.3 Digestão enzimática e análise de peptídeos por cromatografia líquida	12

acoplada a espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> (CLAE-EM/EM).....	
3.3.1 Digestão enzimática com tripsina e pepsina.....	12
3.3.2 Validação do método desenvolvido.....	15
4 Materiais e métodos.....	16
4.1 Materiais.....	16
4.2 Métodos.....	16
4.2.1 Preparo das soluções padrão e de reagentes.....	16
4.2.2 Metodologia para digestão com tripsina.....	17
4.2.2.1 Extração com banho de ultrassom.....	17
4.2.2.2 Extração em fase sólida (EFS).....	18
4.2.2.3 Digestão enzimática com tripsina.....	19
4.2.2.4 Análise Confirmatória por CLAE-EM/EM – Diferenciação entre CMP e pseudo-CMP.....	20
4.2.3 Metodologia para digestão com pepsina.....	20
4.2.3.1 Precipitação das proteínas.....	20
4.2.3.2 Digestão enzimática com pepsina.....	21
4.2.3.2.1 Otimização do volume de amostra.....	21
4.2.3.2.2 Otimização do tempo de digestão.....	22
4.2.3.3 Análise dos produtos da digestão com pepsina por CLAE-EM/EM.....	22
4.2.4 Validação da Metodologia utilizando digestão com pepsina.....	23
4.2.4.1 Faixa de Linearidade.....	23
4.2.4.2 Limites de Detecção e de Quantificação.....	23
4.2.4.3 Efeito de Matriz.....	24
4.2.4.4 Testes de especificidade.....	24
4.2.4.5 Repetitividade e Reprodutibilidade.....	24

4.2.4.6	Testes de incubação de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em leite.....	25
4.2.4.7	Análise de amostras reais.....	25
4.2.5	Equipamentos.....	25
5	Resultados e Discussões.....	27
5.1	Metodologia para digestão com tripsina.....	27
5.1.1	Precipitação utilizando banho de ultrassom.....	27
5.1.2	Extração em fase sólida (EFS) para digestão com tripsina.....	31
5.1.3	Parâmetros de espectrometria de massas – digestão com tripsina.....	32
5.1.4	Cromatografia Líquida – digestão com tripsina.....	35
5.2	Metodologia para digestão com pepsina.....	39
5.2.1	Digestão com pepsina.....	39
5.2.2	Parâmetros de espectrometria de massas – digestão com pepsina.....	40
5.2.3	Otimização do volume de amostra.....	41
5.2.4	Otimização do tempo de digestão.....	42
5.2.5	Validação da Metodologia utilizando digestão com pepsina.....	43
5.2.5.1	Faixa de Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	43
5.2.5.2	Efeito de Matriz.....	46
5.2.5.3	Teste de especificidade.....	47
5.2.5.4	Repetitividade e Reprodutibilidade.....	49
5.2.5.5	Teste de incubação de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em leite.....	50
5.2.5.6	Análise de amostras reais.....	50
6	Conclusão.....	52
7	Bibliografia.....	54
	Anexos.....	57

## INDICE DE ANEXOS

I	Fórmulas e cálculos do teste-t para verificação de igualdade entre as curvas analíticas dos métodos de extração oficial (MO) e com banho de ultrassom (MUS)...	57
II	Descrição dos parâmetros de otimização do analisador de massas (CLAE-EM/EM).....	60
III	Espectros de varredura e fragmentação do íon molecular AIN-T (produto da digestão do pseudo-CMP com pepsina) e MAI-INT (produto da digestão do CMP com pepsina).....	61
IV	Dados brutos da avaliação de desempenho do método de extração utilizando banho de ultrassom.....	66
V	Dados brutos do experimento de Repetitividade e Reprodutibilidade do método com pepsina.....	67



## INDICE DE TABELAS

Tabela I. Requisitos físico-químicos do leite cru resfriado dentro da propriedade rural.....	5
Tabela II. Composição (porcentagem) do leite de vacas de diferentes raças especializadas no Brasil de regiões temperadas.....	6
Tabela III. Composição das frações protéicas do leite.....	7
Tabela IV. Avaliação do método de extração em banho de ultrassom (MUS).....	18
Tabela V. Testes realizados para otimização dos solventes de condicionamento do cartucho e eluição dos analitos na extração em fase sólida – EFS.....	19
Tabela VI. Preparo da curva analítica utilizada para quantificação no desenvolvimento do método com pepsina.....	21
Tabela VII. Volumes de amostra testados para otimização da resposta dos analitos no espectrômetro de massas.....	22
Tabela VIII. Otimização do tempo de incubação do caseinomacropéptídeo (CMP) com pepsina.....	22
Tabela IX. Avaliação da repetitividade, reprodutibilidade, exatidão e precisão do método de digestão com pepsina.....	25
Tabela X. Resultados da avaliação de desempenho do método utilizando banho de ultrassom na extração (MUS) em comparação ao método oficial (MO).....	28
Tabela XI. Resultados do teste-t, com 95% de confiança, para similaridade entre as curvas analíticas do método oficial (MO) e do método utilizando banho de ultrassom (MUS).....	29
Tabela XII. Resultados da avaliação de desempenho do método utilizando banho de ultrassom na extração de caseinomacropéptídeo (CMP) em leite bovino.....	30

Tabela XIII. Parâmetros da ionização por <i>eletrospray</i> no modo positivo para digestão com tripsina.....	34
Tabela XIV. Parâmetros otimizados para análise no espectrômetro de massas dos peptídeos sintéticos por ionização no modo positivo para digestão com tripsina.....	34
Tabela XV. Gradiente de fase móvel utilizado na separação cromatográfica.....	35
Tabela XVI. Parâmetros para a ionização por <i>eletrospray</i> no modo positivo para digestão com pepsina.....	40
Tabela XVII. Parâmetros do espectrômetro de massas para análise dos peptídeos da digestão com pepsina e ionização no modo positivo.....	40
Tabela XVIII. Gradiente de fase móvel utilizado na cromatografia líquida para análise dos peptídeos da digestão com pepsina.....	41
Tabela XIX. Resumo dos resultados dos ensaios de linearidade determinados pela curva analítica dos peptídeos sintéticos.....	45
Tabela XX. Resumo dos resultados dos limites de detecção e de quantificação, determinados pela curva analítica dos peptídeos sintéticos.....	46
Tabela XXI. Resultados do ensaio de repetitividade e reprodutibilidade para avaliação de desempenho do método utilizando pepsina na digestão de caseinomacropéptido (CMP) em leite bovino.....	49

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de aminoácidos das variantes genéticas (A e B) do CMP e do pseudo-CMP. Os pontos de variação genética A e B estão entre colchetes. Os resíduos de Serina (S) em negrito representam os sítios de fosforilações e os resíduos de tirosina (T) sublinhados representam os sítios de glicosilações.....	2
Figura 2. Estrutura da micela de caseína. (Fonte: Chanokphat, 2005) <sup>24</sup> .....	7
Figura 3. Esquema do processo enzimático na produção de queijos: clivagem da k-caseína pela ação da enzima quimosina, na qual a para-k-caseína precipita (queijo) e o caseinomacropéptido (CMP) permanece solúvel no soro.....	8
Figura 4. Esquema do processo de proteólise do leite por ação de proteases liberadas por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	10
Figura 5. Pontos de clivagem da digestão enzimática do caseinomacropéptido (CMP) e do pseudo-caseinomacropéptido (pseudo-CMP) utilizando tripsina. Quatro péptidos menores são gerados: Péptidos da clivagem parcial MAIPPKK (CMP) e AIPPKK (pseudo-CMP) e os péptidos da clivagem total MAIPPK (CMP) e AIPPK (pseudo-CMP).....	13
Figura 6. Pontos de clivagem da digestão enzimática do caseinomacropéptido (CMP) e do pseudo-caseinomacropéptido (pseudo-CMP) utilizando pepsina. Dois péptidos menores são gerados: o péptido MAIPPKKNQDKTEIPTINT (19 aminoácidos e massa molecular de 2140 Daltons) oriundo do CMP e o péptido AIPPKKNQDKTEIPTINT (18 aminoácidos e massa molecular 2008 Daltons) oriundo do pseudo-CMP.....	14
Figura 7. Curva analítica do caseinomacropéptido (CMP) em matriz (leite cru): MO = método oficial de extração; MUS = método de extração utilizando banho de ultrassom. ....	29

Figura 8. Protocolo de extração em fase sólida para purificação e concentração dos analitos. Todos os testes foram realizados com padrão de caseinomacropeptídeo (CMP) em solvente (água deionizada) na concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	32
Figura 9. Estrutura do CMP e pseudo-CMP e os pontos de clivagem da tripsina (tesouras). Clivagem total ocorre entre os aminoácidos lisina (K-K) e a clivagem parcial entre os aminoácidos lisina e (K-N).....	33
Figura 10. Cromatograma dos peptídeos sintéticos em solvente (fase móvel A), da digestão trípica do pseudo-CMP (primeiro pico) e do CMP (segundo pico).....	36
Figura 11. Cromatogramas do padrão de CMP após digestão com tripsina. (A) Digestão do padrão em solvente e (B) digestão em matriz.....	37
Figura 12. (A) Amostra positiva para presença de CMP, marcador da adição de soro de queijo. (B) Amostra positiva para contaminação por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	37
Figura 13. Curva analítica de CMP em solvente e em matriz, após digestão com tripsina.....	38
Figura 14. Estrutura do CMP e pseudo-CMP indicando o ponto de clivagem da pepsina.....	39
Figura 15. Otimização do volume de amostra para digestão com pepsina.....	42
Figura 16. Otimização do tempo de digestão de caseinomacropeptídeo (CMP 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com pepsina.....	43
Figura 17. Curva analítica em solvente (água deionizada com 0,1% de ácido fórmico) dos peptídeos sintéticos da digestão com pepsina.....	44
Figura 18. (A, B, C e D): Cromatogramas do primeiro ponto da curva 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da curva e do terceiro ponto de concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , referentes aos Limite de Detecção (A e B) e de Quantificação (C e D), respectivamente.....	45

Figura 19. Curva analítica da digestão com pepsina do caseinomacropéptido (CMP) para identificação do efeito de matriz. Curva em solvente (água deionizada com 0,1% de ácido fórmico), em matriz (adicionado antes da extração) e em <i>tissue standard</i> (padrão adicionado após a extração). Faixa de concentração 1 a 120 µg mL <sup>-1</sup> .....	47
Figura 20. Padrão de caseinomacropéptido (CMP) sem digestão com pepsina.....	48
Figura 21. Cromatograma do branco de reagentes (pepsina e glicina), sem adição do padrão de caseinomacropéptido (CMP).....	48
Figura 22. (A) Placa contendo leite; (B) Placa contendo leite incubado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Tempo de incubação: 72 horas. Temperatura de incubação 25 °C.....	50
Figura 23. Gráfico da determinação de caseinomacropéptido em amostras de leite cru de diversos estados do Brasil. RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; GO: Goiás; MG: Minas Gerais; P: Pará. A numeração refere-se aos laticínios coletados em cada estado.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF: ácido fórmico.

aas: aminoácidos.

CLAE-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem*.

EFS: extração em fase sólida.

HAc: ácido acético.

LD: limite de detecção.

LQ: limite de quantificação.

MeOH: metanol.

NH<sub>4</sub>Bic: bicarbonato de amônio.

TFA: ácido trifluoroacético

TCA: ácido tricloroacético.

MRM: do inglês “*multiple reaction monitoring*”

MAI-INT: peptídeo sintético da digestão do CMP com pepsina.

AI-INT: peptídeo sintético da digestão do pseudo-CMP com pepsina.

MAI-K: peptídeo sintético da digestão do CMP com tripsina.

AI-K: peptídeo sintético da digestão do pseudo-CMP com tripsina.

## RESUMO

A adição de soro de queijo ao leite é uma das fraudes mais frequentes, tendo em vista a similaridade entre as matrizes, não havendo necessidade de correções de pH, teor de proteínas dentre outros parâmetros físico-químicos. A metodologia analítica, aplicada pelos laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para a detecção deste tipo de fraude, está baseada na determinação do índice de caseinomacropeptídeo (CMP), composto que está presente no soro de queijo após o processamento. Entretanto, a presença de bactérias no leite, principalmente *Pseudomonas fluorescens*, por estocagem indevida, produz peptídeo semelhante, o pseudo-caseinomacropeptídeo (pseudo-CMP). O método atualmente utilizado pelo MAPA não é capaz de diferenciar a fraude por adição de soro de queijo da contaminação bacteriana. A partir desta consideração, neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos analíticos capazes de diferenciar e quantificar o peptídeo marcador da adulteração (CMP) do peptídeo gerado pela contaminação bacteriana do leite (pseudo-CMP). Ambas as metodologias utilizaram cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas em *tandem* e *eletrospray* no modo positivo. A preparação das amostras foi baseada na digestão enzimática (com tripsina e a pepsina) dos peptídeos. Os parâmetros de espectrometria de massas foram otimizados com peptídeos sintéticos correspondentes aos fragmentos gerados pela digestão enzimática. Na metodologia com tripsina foi realizada pré-concentração, purificação dos analitos e mudança de solvente por extração em fase sólida (EFS) utilizando o cartucho de estireno-divinilbenzeno como fase sólida. Para extração dos analitos foi desenvolvido um método utilizando banho de ultrassom. Este método foi validado e os coeficientes de variação dos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade, respectivamente foram: de 4,6 a 6,8% e de 1,1 a 3,0%. A faixa de linearidade foi de 25 a 200 mg mL<sup>-1</sup> com coeficientes de determinação maiores que 0,99. Na metodologia com pepsina não houve a necessidade de EFS e a avaliação de desempenho do método foi satisfatória. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 1 e 5 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente com coeficientes de variação menores que 10 e 16% para os ensaios de repetitividade e reprodutibilidade. A análise de amostras reais mostrou que ambos os métodos são capazes de identificar e diferenciar adulteração de contaminação bacteriana do leite.

## ABSTRACT

The addition of whey to milk is one of the most frequent frauds due to the similarity between matrices, with no need of pH corrections, protein content among and other physicochemical parameters. The analytical methodology used in the laboratories of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), for detecting this fraud is based in the determination of the caseinomacropeptídeo (CMP) index, which is a compound present in the whey. However, the presence of bacteria in milk, especially *Pseudomonas fluorescens*, for improper storage, can produce a very similar peptide called pseudo-caseinomacropeptídeo (pseudo-CMP). The methodology currently used by MAPA is not able to differentiate fraud by addition of whey or by bacterial contamination. From this consideration, in this work two analytical methods have been proposed to differentiate and quantify the CMP from the pseudo-CMP. These methodologies uses liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and electrospray ionization in positive mode. The sample preparation was based on the enzymatic digestion (with pepsin and trypsin) of the peptides. The parameters for mass spectrometry weee optimized with synthetic peptides corresponding to fragments generated by enzymatic digestion. When trypsin was used, the pre-concentration, purification of the analytes and change of solvent, has been done by solid phase extraction (SPE) with styrene-divinylbenzene cartridge. The extraction step was performed by ultrasound bath. The methodology was fully validated with coefficient of variation for repeatability and reproducibility, respectively ranging from 4.6 to 6.8% and 1.1 to 3.0%. The linear range was evaluated from 25 to 200 mg mL<sup>-1</sup> with correlation coefficients greater than 0.99. In the methodology that uses pepsin, the SPE was not necessary to ensure the performance of the method. The limits of detection and quantification were 1 and 5 μg mL<sup>-1</sup>, respectively, with coefficients of variation lower than 10 and 16% for the repeatability and reproducibility. The analysis of real samples showed that both methods are capable to differentiate and identify adulteration from the bacterial contamination in milk.



## 1. INTRODUÇÃO

A adulteração de leite e produtos lácteos por adição de soro de queijo tem sido alvo de muitos estudos, principalmente, após as fraudes detectadas em 2007 em laticínios no estado de Minas Gerais<sup>1</sup>. A legislação brasileira estabelece que o leite pasteurizado, o leite esterilizado e o leite em pó não possam conter sólidos de soro de queijo acima do especificado na Instrução Normativa nº69 (2006) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>2</sup>. No entanto, a adulteração, pela adição deste soro, é economicamente atrativa, pois além de utilizar um resíduo da indústria queijeira, aumenta o volume do leite comercializado, o que torna a concorrência mercadológica desleal, prejudicando a empresa idônea e o consumidor.

O caseinomacropéptido (CMP) é um péptido específico encontrado no soro de queijo, que é formado a partir da clivagem da  $\kappa$ -caseína pela ação da quimosina. Pode também ser produzido pela ação da proteólise bacteriana (Pseudo-CMP), decorrente da contaminação do leite, principalmente por bactérias psicotróficas<sup>3-6</sup>. Uma vez que a quantidade de CMP no soro é proporcional à quantidade de  $\kappa$ -caseína no leite, é possível detectar fraude no leite pela adição de soro a partir da quantificação de CMP na amostra. Entretanto, os métodos utilizados para detecção da adulteração não são específicos, pois não são capazes de diferenciar o CMP e o Pseudo-CMP. A principal dificuldade no controle desse tipo de fraude é a atuação das empresas fraudulentas, as quais preferem uma multa por falta de higienização, no caso de contaminação por bactérias psicotróficas, do que responderem por crime contra a saúde pública e contra a economia popular.

Existem quatro tipos principais de caseína no leite bovino:  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ -, e  $\kappa$ -caseína<sup>7</sup>. Todas as quatro são fosforiladas em resíduos específicos de serina e em adição a  $\kappa$ -caseína é glicosilada em diversos graus<sup>8</sup>. Assim, o CMP é heterogêneo e contém todos os sítios originais de modificações pós-traducionais da  $\kappa$ -caseína: sítios de glicosilação e fosforilação do CMP (Figura 1). Quatro variantes genéticas do CMP foram identificados, oriundos da  $\kappa$ -caseína A, B, Ce E<sup>9-11</sup>. As variantes A e B são as formas mais frequentes no

leite bovino<sup>12,13</sup>. Ambas as variantes existem em formas individualmente e duplamente fosforilada<sup>12,14</sup> e podem ser expressas de modo homozigoto ou heterozigoto.

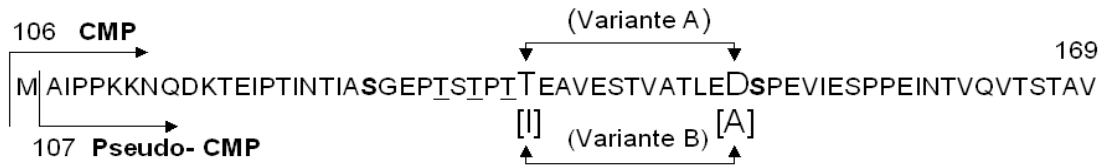


Figura 1. Sequência de aminoácidos das variantes genéticas (A e B) do CMP e do pseudo-CMP. Os pontos de variação genética A e B estão entre colchetes. Os resíduos de Serina (S) em negrito representam os sítios de fosforilações e os resíduos de tirosina (T) sublinhados representam os sítios de glicosilações.

O controle de qualidade do leite e derivados deve tornar-se cada vez mais rigoroso e frequente. A indústria de laticínios e as entidades responsáveis por assegurar a autenticidade destes produtos necessitam ter a sua disposição meios que possam dar respostas precisas em tempo real, ao longo das várias etapas de fabricação e comercialização, minimizando os custos decorrentes de qualquer anomalia que possa surgir.

As técnicas cromatográficas e a eletroforese capilar bem como os ensaios imunológicos, têm sido os mais adequados para avaliar a qualidade e autenticidade dos produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. O desenvolvimento de metodologias rápidas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>15-17</sup> e eletroforese capilar (EC) tem melhorado consideravelmente os tempos de análise<sup>18</sup>. Além disso, o acoplamento das técnicas cromatográficas à espectrometria de massa (MS) tem possibilitado a identificação incontestável destas substâncias<sup>19-21</sup>.

O desenvolvimento de um método para diferenciação entre CMP e Pseudo-CMP, se faz necessário, tendo em vista o grande número de fraudes na indústria de laticínios. A adição de soro de queijo ao leite não somente adultera a composição do produto, causando diminuição do valor protéico do leite, mas constitui uma grave infração penal, configurada como crime à economia popular. Para as agências reguladoras, é de extrema importância o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos capazes de determinar de modo eficaz a

presença de peptídeos marcadores em leite. Assim sendo, o presente trabalho vem ao encontro desta importante demanda.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver metodologia analítica capaz de diferenciar e identificar de modo inequívoco a adulteração do leite por adição de soro de queijo da contaminação por microorganismos psicotróficos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas em *tandem* (CLAE-EM/EM) e análise proteômica.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar metodologia analítica para a determinação de caseinomacropeptídeo e pseudo-caseinomacropeptídeo em leite utilizando digestão com tripsina e análise confirmatória por CLAE-EM/EM (Metodologia 1);
  
- Avaliar o desempenho da extração dos analitos utilizando banho de ultrassom por cromatografia de exclusão molecular e detecção por arranjo de diodos comparado à metodologia descrita na Instrução Normativa nº 69 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN 69 – MAPA);
  
- Estabelecer um protocolo de extração em fase sólida para purificação e pré-concentração dos analitos em substituição ao procedimento de coleta de frações descrita na Instrução Normativa nº 07 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN 07 – MAPA);
  
- Implementar e validar metodologia analítica para a determinação de caseinomacropeptídeo e pseudo-caseinomacropeptídeo em leite utilizando digestão com pepsina e análise quantitativa por CLAE-EM/EM (Metodologia 2);

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE

##### 3.1.1 Legislação e características físico-químicas do leite

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, descrito na Instrução Normativa N° 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN 51, MAPA)<sup>22</sup>, o leite cru refrigerado deve apresentar os seguintes requisitos mínimos de qualidade dentro da propriedade rural (Tabela I):

Tabela I. Requisitos físico-químicos do leite cru resfriado dentro da propriedade rural.

Requisitos	Limites
Gordura, g/100g	> 3,0 (leite integral*)
Densidade relativa a 15°C g/mL	1,028 a 1,034
Acidez titulável, g ácido láctico/100 mL	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado, g/100 g	> 8,4
Índice crioscópico	Máximo -0,512 °C
Proteínas, g/100 g	> 2,9

\* É proibida a realização de qualquer processo de padronização ou desnate na propriedade rural<sup>22</sup>. Adaptado da fonte 22.

##### 3.1.2 Composição do leite

O leite é composto por diferentes substâncias, cuja função é fornecer nutrientes e proteção imunológica para o neonato. Além dessas funções biológicas, o leite oferece grandes possibilidades de processamento industrial para a obtenção de diversos produtos para a alimentação humana. As características físico-químicas do leite são muito importantes para a elaboração de diferentes produtos lácteos.

A mudança na composição do leite pode alterar significativamente o seu valor nutricional como matéria-prima para a fabricação de derivados. Para ilustrar esse fato, uma diminuição de 0,5% de sólidos totais ou 0,1% em proteínas pode significar uma perda de até 5

toneladas de leite em pó ou 1 tonelada de queijo, respectivamente, para cada milhão de litros de leite processados na indústria. De acordo com a Tabela II a composição média do leite de vaca das diferentes raças especializadas no Brasil não apresenta variações significativas para proteínas, cinzas e lactose. Entretanto, a raça Jersey apresenta maior porcentagem de gordura em relação às outras raças.

Tabela II. Composição (porcentagem) do leite de vacas de diferentes raças especializadas no Brasil de regiões temperadas.

(%)	Holandesa	Jersey	Pardo-suíço
Proteínas	3,29	3,98	3,64
Gordura	3,54	5,13	3,99
Cinzas	0,72	0,77	0,74
Lactose	4,68	4,83	4,94
EST*	12,16	14,42	13,08

Fonte: Adaptado da referência 23.

(\*) EST - Extrato seco total

### 3.1.3 Proteínas do leite

As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grandes grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas podem ser definidas como a fração das proteínas do leite que sofre precipitação em pH 4,6; o restante das proteínas que não sofrem essa precipitação é chamado coletivamente de proteínas do soro.

As caseínas são fosfoproteínas sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e secretadas na forma de micelas (agrupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons, como o fosfato de cálcio), consistindo de quatro principais variantes genéticas:  $\alpha$ -S1,  $\alpha$ -S2,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína<sup>23</sup>. A composição destas variantes em relação à proteína total está descrita na Tabela III.

Tabela III. Composição das frações protéicas do leite.

<b>Tipo de proteína</b>	<b>% em relação à proteína total</b>
$\alpha$ -caseína (S1 e S2)	45
$\beta$ -caseína	24
Proteínas do soro	19
$\kappa$ -caseína	12

Fonte: Adaptado da referência 23.

Sendo as caseínas responsáveis pela estabilização da emulsão, vários modelos têm sido propostos nos últimos 50 anos para definir a sua estrutura. O modelo da submicela foi o mais estudado. Neste modelo, as caseínas se agregam via interações hidrofóbicas em subunidades de 15-20 moléculas cada<sup>24</sup>. O padrão de interação é tal que provoca uma variação no teor de  $\kappa$ -caseína nestas submicelas. A superfície é rica em  $\kappa$ -caseína e a região pobre ou totalmente deficiente em  $\kappa$ -caseína está localizada no interior da micela como representado na Figura 2.

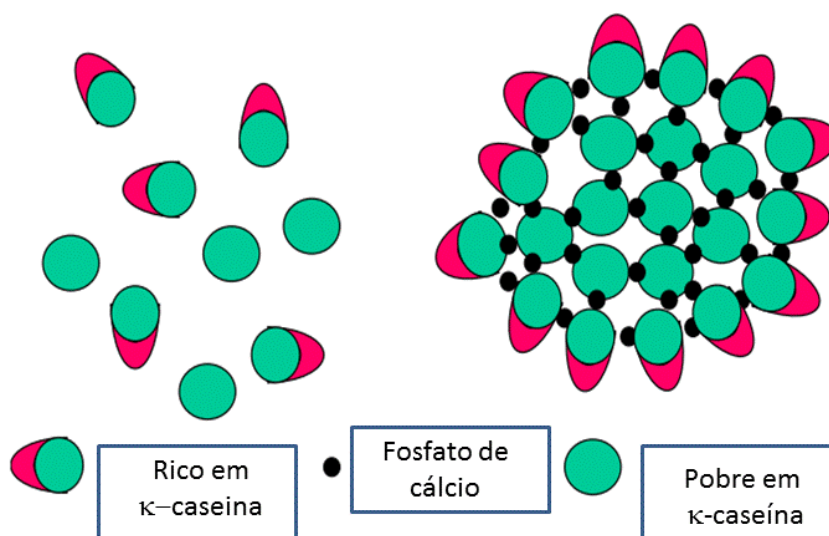


Figura 2. Estrutura da micela de caseína. (Fonte: Chanokphat, 2005)<sup>24</sup>.

## 3.2 FRAUDES POR ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO

### 3.2.1 Processo de produção de queijo

A indústria de produção de queijo produz aproximadamente 9 kg de soro para cada quilograma do produto final. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é “o produto fresco ou maturado que se obtêm por separação parcial do soro do leite, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de ácidos orgânicos, isolados ou combinados. A função do coalho, utilizado em todos os tipos de queijo exceto os frescos tipo “cottage”, é precipitar a caseína presente no leite. A principal enzima responsável por essa ação é a renina (quimosina), uma fosfoproteína de ação proteolítica específica que atua hidrolisando ligações peptídicas, entre os aminoácidos (aas) 105-106 da  $\kappa$ -caseína (169 aas), transformando-a em para- $\kappa$ -caseína (105 aas) que precipita e em caseinomacropéptídeo (64 aas) que permanece solúvel no soro (Figura 3). As proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, assim como o péptídeo caseinomacropéptídeo, estão presentes em grandes quantidades no soro de queijo<sup>25</sup>. O caseinomacropéptídeo possui massa aproximada de 7000 Da e é comumente utilizado como marcador da adulteração de leite por adição de soro de queijo<sup>16,19, 26</sup>.

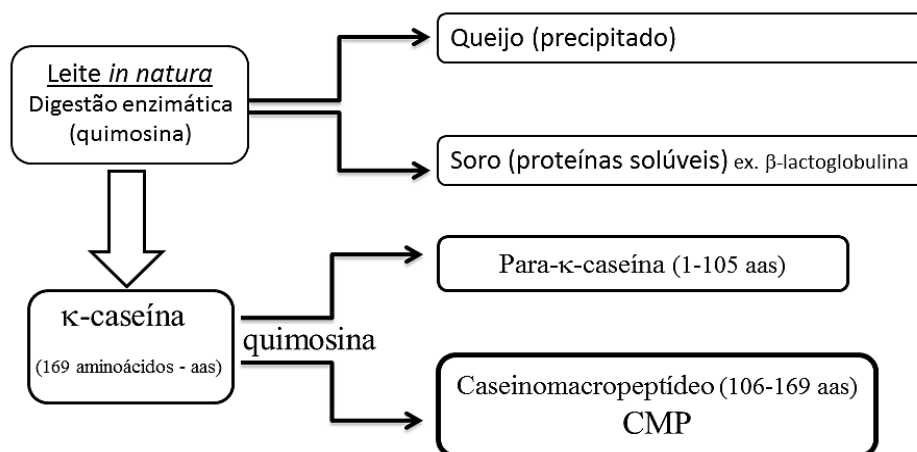


Figura 3: Esquema do processo enzimático na produção de queijos: clivagem da  $\kappa$ -caseína pela ação da enzima quimosina, na qual a para- $\kappa$ -caseína precipita (queijo) e o caseinomacropéptídeo (CMP) permanece solúvel no soro.



Outro método de coagulação da caseína é adicionar ácido orgânico ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5). Neste pH as micelas de caseína agregam-se e precipitam. Esse método fornece queijos de qualidade inferior aos produzidos pelo método enzimático.

### 3.2.2 Proteólise bacteriana

A espécie mais comum de bactéria psicrotrófica encontrada no leite é *Pseudomonas fluorescens*. A atividade de lipases e proteases desta bactéria é uma das causas mais frequentes de alterações no sabor e demais características organolépticas do leite. A protease de *P. fluorescens* é termoestável e causa alterações no leite refrigerado. A enzima foi isolada e caracterizada por Mayerhofer e colaboradores<sup>27</sup>, que demonstraram que se trata de uma enzima extracelular, estável ao calor requerendo 15 horas em temperatura de 62,8 graus centígrados para sua completa desativação. Estes autores encontraram que uma quantidade tão baixa quanto 0,2 unidades de enzima por mL de leite mantido a 4 graus por 30 dias já era suficiente para provocar sabor amargo no leite. Este amargor é provocado pela presença de resíduos de tirosina e de triptofano livres no leite, o que é indicador característico de proteólise<sup>27</sup>.

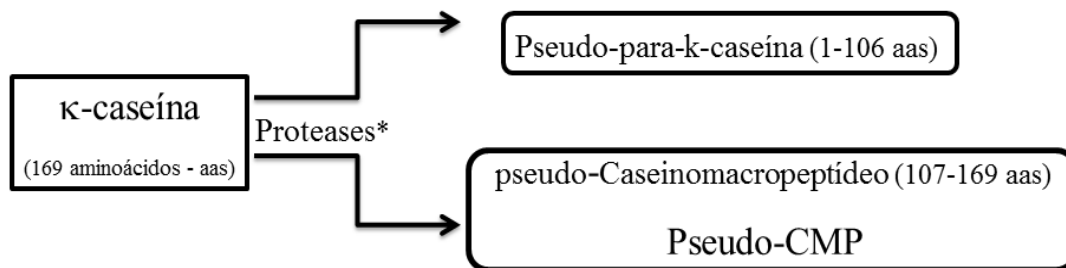
Quando incubada em leite desnatado em temperatura de refrigeração, *P. fluorescens* já apresenta proteases intracelulares após apenas 20 horas de incubação<sup>28</sup>. As proteases extracelulares surgem após 7 dias de incubação. A protease extracelular foi caracterizada por Kohlmann e colaboradores como sendo estável entre 7 e 52 graus e na faixa de pH de 5,5 a 8,5<sup>28</sup>. Estes autores também verificaram a inibição da protease pela adição de EDTA, um agente quelante, o que indica que se trata de uma metaloprotease.

Apesar de *P. fluorescens* produzir diversas proteases extracelulares, todas têm características bastante similares, inclusive massa molecular (cerca de 50 -55 kA). Em geral, trata-se de proteinases zinco-dependente. Koka&Weimer utilizaram micelas artificiais de caseína com marcadores de fluorescência para determinar a cinética de uma protease isolada

de *P. fluorescens* RO98. Esta mostrou a hidrólise preferencial da  $\kappa$ -caseína, que constitui a camada mais externa das micelas e que é a grande responsável pela estabilidade destas <sup>29</sup>.

Dogan e Boor isolaram 338 cepas de *Pseudomonas spp.* em leite cru e pasteurizado em plantas de produção de laticínios. Deste total 76% eram *P. fluorescens*, as demais foram caracterizadas como *Pseudomonas putida* sendo que 51% de todos os isolados eram protease positivos <sup>30</sup>. A correlação entre o número de bactérias e a detecção de alterações no sabor de leite processado e contaminado por *Pseudomonas spp.* estabeleceu  $\geq 10^7$  UFC/mL como a quantidade de bactérias suficiente para provocar a proteólise causando alterações organolépticas <sup>31</sup>.

As proteases de *P. fluorescens* quando presentes no leite são termo resistentes e continuam a degradação do leite mesmo após tratamento térmico. Estas proteases clivam a  $\kappa$ -caseína entre os aminoácidos 106 e 107, muito semelhante à quimosina, produzindo o pseudo-caseinomacropeptídeo (63 aas) e o pseudo-para- $\kappa$ -caseína (106 aas) (Figura 4). A diferença entre CMP e pseudo-CMP é de apenas um aminoácido (metionina) ocasionando muitas vezes, dependendo da técnica, resultados falsos positivos.



\*Proteases produzidas por *Pseudomonas fluorescens*

Figura 4: Esquema do processo de proteólise do leite por ação de proteases liberadas por *Pseudomonas fluorescens*.

### **3.2.3 Legislação para controle de leite e produtos lácteos**

#### **3.2.3.1 Instrução Normativa Nº 68, 12 de dezembro de 2006 (IN 68, MAPA)<sup>32</sup>**

O objetivo desta instrução normativa é oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa (IN), determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários (Art. 1º).

Além de outros métodos analíticos, a IN 68 apresenta detalhadamente o método para detecção de fraudes por adição de soro de queijo em leite, denominado Índice de CMP. Este método baseia-se na detecção e quantificação de caseínomacropeptídeo (CMP) proveniente da ação proteolítica de enzimas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV).

#### **3.2.3.2 Instrução Normativa Nº 69, 13 de dezembro de 2006 (IN 69, MAPA)<sup>2</sup>**

O objetivo desta IN é instituir critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado Índice CMP, de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (Art. 1º).

Somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L (trinta miligramas por litro), o leite de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa poderá ser destinado ao abastecimento direto (Art. 2º).

Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30mg/L (trinta miligramas por litro) e 75mg/L (setenta e cinco miligramas por litro), este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos.

Quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg/L (setenta e cinco miligramas por litro), este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino.

### **3.2.3.3 Instrução Normativa Nº 07, 10 de março de 2010 (IN 07, MAPA)<sup>33</sup>**

Esta instrução normativa aprovou o Método Oficial de Determinação de CMP (caseinomacropéptido) em leite, por HPLC, Eletroforese Capilar e Espectrometria de Massas em leite, em apresentações integrais, semi-desnatadas e desnatadas, tratados por processos de UHT ou pasteurização (Art. 1º). O método de que trata esta Instrução Normativa foi adotado pelos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (Art. 2º).

## **3.3 DIGESTÃO ENZIMÁTICA E ANÁLISE DE PEPTÍDEOS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MODO *TANDEM* (CLAE-EM/EM)**

A digestão enzimática <sup>19,34-36</sup> é muito utilizada na análise de proteínas, por espectrometria de massas, pois estas geralmente possuem massas moleculares altas, além de variantes genéticas e sítios de modificações traducionais. A utilização de enzimas promove a clivagem em pontos específicos e conversão das proteínas em um conjunto de peptídeos. Dentre as razões para o uso de peptídeos e não de proteínas intactas é que, de forma geral, proteínas são de difícil manuseio e degradam-se facilmente. Além disso, a sensibilidade dos espectrômetros de massas para a análise de peptídeos é consideravelmente maior, sendo mais eficientes para obter informação estrutural de peptídeos com até 20 aminoácidos <sup>37</sup>.

### **3.3.1 Digestão enzimática com tripsina ou pepsina**

As enzimas tripsina e a pepsina são comumente utilizadas na análise de proteínas <sup>19,25,38,39</sup>. No CMP, a tripsina (EC 3.4.21.2)<sup>40</sup> cliva cadeias de peptídeos e proteínas especificamente na ligação carboxila dos aminoácidos lisina e arginina, enquanto a pepsina (EC 3.4.23.1)<sup>40</sup> cliva preferencialmente nas ligações carboxila entre aminoácidos hidrofóbicos

tirosina e (iso)leucina. Para a maioria das proteínas, esta clivagem resulta em produtos de digestão de faixa de tamanho apropriados para análise por espectrometria de massas. Para identificar as proteínas (ou peptídeos) de interesse o espectro de massas gerado pode ser comparado com os fragmentos obtidos em programas específicos de sequenciamento de proteínas.

A Figura 5 mostra a estrutura do caseinomacropeptídeo (CMP) e do pseudo-caseinomacropeptídeo (pseudo-CMP) e os pontos de clivagem pela ação da tripsina, a qual produz quatro peptídeos menores de massa molecular que varia entre (500–780 g mol<sup>-1</sup>). A digestão com tripsina pode ser parcial ou total, no caso de digestão total a clivagem ocorre entre as lisinas (K-K).

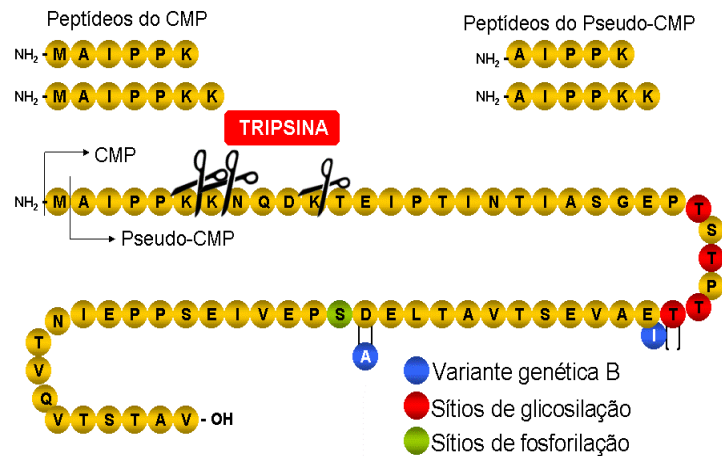


Figura 5: Pontos de clivagem da digestão enzimática do caseinomacropeptídeo (CMP) e do pseudo-caseinomacropeptídeo (pseudo-CMP) utilizando tripsina. Quatro peptídeos menores são gerados: Peptídeos da clivagem parcial MAIPPKK (CMP) e AIPPKK (pseudo-CMP) e os peptídeos da clivagem total MAIPPK (CMP) e AIPPK (pseudo-CMP).

A figura 6 apresenta os pontos de clivagem do CMP e do pseudo-CMP pela ação da enzima pepsina, neste caso são gerados dois peptídeos com massas moleculares de 2008 Da (pseudo-CMP) 2140 Da (CMP).



A técnica CLAE-EM/EM se tornou uma ferramenta indispensável na análise proteômica, por ser uma técnica seletiva, sensível, capaz de obter limites de detecção (LD) na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e ser especialmente adequada devido à sua seletividade.

### **3.3.2 Validação do método desenvolvido**

Validar ensaios laboratoriais é estabelecer a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido na execução do ensaio e na obtenção do resultado.

Segundo a norma NBR ISO/IEC 17025, “Validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. Os passos necessários para a validação de um método analítico incluem o estudo dos seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez, incerteza da medição <sup>41</sup>.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Solventes: água ultrapura (Milli-Q) com resistividade controlada em 18,2 MΩm, metanol (JT BAKER, grau de pureza 100%) e acetonitrila (Tedia, grau de pureza 99,9%). Todos os solventes utilizados neste trabalho possuem grau de pureza para análise de resíduo.

Reagentes: tripsina de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich), pepsina da mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich), glicina (VETEC), ácido acético glacial (J.T Baker), ácido trifluoroacético (Sigma-Adrich), grau de pureza  $\geq 99\%$ , ácido tricloroacético (Merck, grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ), ácido fórmico (Sigma-Aldrich, grau de pureza), bicarbonato de amônio bioultra (Fluka/Sigma-Aldrich, grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ).

Padrões analíticos utilizados no desenvolvimento do trabalho: caseinomacropéptídeo (CMP), obtido da DaviscoFoods (MN, EUA), com grau de pureza 91,3%; MAIPPKK e AIPPKK, peptídeos sintéticos da digestão com tripsina, Proteimax (São Paulo, Brasil), grau de pureza 100%; MAIPPKKNQDKTEIPTINT e AIPPKKNQDKTEIPTINT, peptídeos sintéticos da digestão com pepsina, obtidos da Mimotopes (Austrália), com graus de pureza 96,0% e 95,0%, respectivamente. Todos os padrões foram conservados em temperaturas entre -30 °C e -10 °C.

Na extração em fase sólida utilizou-se o cartucho STRATA-X<sup>TM</sup>, 200 mg, 6 mL da (Phenomenex). Este cartucho tem como fase estacionária o polímero estireno-divinilbenzeno considerado ideal para análise de proteínas e peptídeos <sup>42</sup>.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo das soluções padrão e de reagentes

A preparação da solução de trabalho de CMP (concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>), foi realizada pela pesagem de aproximadamente 10 mg do padrão (corrigido pelo grau de pureza



0,0110g) e transferido para balão volumétrico de 10 mL tendo o volume ajustado com água ultrapura e 5 % de metanol.

A solução de tripsina foi preparada pela pesagem de 20 mg do reagente e diluição em balão volumétrico de 100 mL com ácido acético 50 mmol L<sup>-1</sup>. O reagente pepsina foi preparado na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> com água ultrapura. Ambas as soluções foram divididas em alíquotas em frascos de 1,5 mL e mantidas em temperaturas abaixo de -20 °C.

As soluções dos peptídeos sintéticos foram preparadas conforme instrução do fabricante, na concentração final de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Soluções na faixa de 200 a 500 ngmL<sup>-1</sup> foram preparadas para otimização dos parâmetros de espectrometria de massas. Todas as soluções foram preparadas pela diluição adequada em acetonitrila:água (50:50) com 1 % de ácido fórmico (AF).

#### **4.2.2 Metodologia para digestão com tripsina**

A metodologia empregada para a identificação da adulteração em leite foi o método utilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN 68, 2006)<sup>2</sup> com algumas adaptações, sendo este o método quantitativo de triagem, seguido de extração em fase sólida, digestão com tripsina e análise confirmatória em sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo *tandem*, CLAE-EM/EM<sup>33</sup>.

##### **4.2.2.1 Extração com banho de ultrassom**

A precipitação das proteínas foi conduzida pela adição de 5 mL de ácido tricloroacético 24% (TCA) em 10 mL de amostra. Após 30 minutos em banho de ultrassom, as amostras foram filtradas em papel qualitativo e 1 mL do extrato foi analisado por Cromatografia Líquida com detecção por arranjo de diodos em coluna de exclusão molecular (CLAE-DAD-CEM). Esta metodologia de extração foi desenvolvida para substituir a precipitação, por gotejamento e agitação magnética, utilizada no método oficial descrito na Instrução Normativa nº 68 (IN 68, 2006)<sup>2</sup>. Para avaliação de desempenho do novo método

foram realizadas duas curvas analíticas, uma pelo método oficial (MO) e outra pelo método utilizando banho de ultrassom (MUS). Para avaliar se há diferença entre os métodos foi feita uma análise estatística comparando os coeficientes lineares e angulares das regressões através do teste-T, as fórmulas utilizadas estão descritas no Anexo I <sup>43</sup>. Posteriormente, a validação do MUS foi feita conforme descrito na Tabela IV.

Tabela IV. Avaliação do método de extração em banho de ultrassom (MUS).

<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
Curva analítica (MUS)	Curva analítica (MUS)	Curva analítica (MUS)
7 replicatas 0,5 LM	7 replicatas 0,5 LM	7 replicatas 0,5 LM
7 replicatas 1,0 LM	7 replicatas 1,0 LM	7 replicatas 1,0 LM
7 replicatas 1,5 LM	7 replicatas 1,5 LM	7 replicatas 1,5 LM

LM = 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Limite máximo segundo Instrução Normativa 69).  
 0,5 LM = 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ / 1,0 LM = 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ / 1,5 LM = 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$

#### **4.2.2.2 Extração em fase sólida (EFS)**

A enzima tripsina tem eficiência máxima na digestão em pH básico (pH 8.0). Como a precipitação utilizou TCA 24% que possui pH ácido (pH 1,5), antes de efetuar a digestão com tripsina foi necessária uma etapa de purificação (mudança de solvente). Alguns testes foram realizados (Tabela V), variando-se os solventes de condicionamento do cartucho, bem como solvente de eluição dos analitos em comparação com o protocolo de extração proposto pelo fabricante. A concentração utilizada para otimização dos solventes de condicionamento e eluição foi de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , concentração máxima de CMP permitido nas amostras (IN 69, 2006)<sup>2</sup>. Para quantificação, a curva analítica foi feita em matriz por adição da solução de CMP 1  $\text{mg mL}^{-1}$ , na faixa de 25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em leite cru, previamente analisado.

Tabela V. Testes realizados para otimização dos solventes de condicionamento do cartucho e eluição dos analitos na extração em fase sólida – EFS.

	<b>Solventes de condicionamento</b>	<b>Solventes de eluição</b>
<b>Protocolo</b>	1) 4 mL de MeOH	5 mL de ACN 90 % e TFA 0,1%
<b>Fabricante</b>	2) 4 mL de água	
<b>Variação 1</b>	1) 4 mL de MeOH	1) 4 mL de ACN 90 % e TFA 0,1%
	2) 4 mL de água	2) 4 mL de ACN 90 % e TFA 1,0%
<b>Variação 2</b>	1) 4 mL de MeOH	1) 4 mL NH <sub>4</sub> Bic 50 mol L <sup>-1</sup>
	2) 4 mL de TFA 0,1%	
<b>Variação 3</b>	1) 4 mL de ACN	1) 4 mL de ACN 90 % e TFA 0,1%
	2) 4 mL de água	2) 4 mL NH <sub>4</sub> Bic 50 mol L <sup>-1</sup>
<b>Variação 4</b>	1) 4 mL de ACN	4 mL de ACN 90 % e TFA 1,0%
	2) 4 mL de TFA 0,1%	

Solventes testados para otimização do método de extração em fase sólida (EFS). MeOH (metanol)-TFA (ácido trifluoroacético) – ACN (acetonitrila) – NH<sub>4</sub>Bic (bicarbonato de amônio).

#### 4.2.2.3 Digestão enzimática com tripsina

Após realização do protocolo de ESF o solvente de eluição foi evaporado sob fluxo de nitrogênio à 42 °C ( $\pm$  2 °C). O extrato seco foi retomado com 1 mL de bicarbonato de amônio 50 mM (pH 8,0), 100  $\mu$ L de uma solução de tripsina 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e homogeneizado em *vortex*. A digestão foi realizada em banho com agitação à 37 °C por 4 horas. O produto da digestão foi diluído 10 vezes em água ultrapura acidificada (0,1% de ácido acético e 0,02% de TFA) e submetidas a análise confirmatória por CLAE-EM/EM.

#### 4.2.2.4 Análise Confirmatória - Diferenciação entre CMP e pseudo-CMP.

Para a determinação das condições do espectrômetro de massas é necessário que os analitos sejam introduzidos um a um por meio de infusão. A descrição dos parâmetros a serem otimizados estão descritos no Anexo II. Primeiramente, efetua-se uma varredura na faixa de massa do analito para determinar o íon molecular (Anexo III). No caso da análise de

peptídeos existem mais de um sítio de ionização e normalmente as moléculas são carregadas com cargas  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ . Após determinar o íon molecular mais intenso é realizada a fragmentação e posterior seleção dos fragmentos (Anexo III). No desenvolvimento de métodos quantitativos são necessários pelo menos dois fragmentos, sendo um quantificador e o(s) outro(s) qualificador (es).

Para a análise confirmatória por CLAE-EM/EM a separação por cromatografia líquida foi realizada utilizando a coluna PLRP-S (Estireno-divinilbenzeno, 15 cm × 4,6 mm, 300 Å)<sup>13</sup>. Os parâmetros para a análise por espectrometria de massas foram definidos utilizando o modo de ionização *electrospray* positivo (ESI +). A quantificação foi realizada no modo de MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*), com duas (ou mais) transições: quantificador e qualificador. Para a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foram utilizados peptídeos sintéticos (produtos de digestão completa e parcial do CMP e pseudo-CMP com tripsina). Esta etapa foi realizada automaticamente pelo software Analyst 1.6.1. A fase móvel foi composta de água (fase A) e acetonitrila (fase B) ambas com 0,1% de ácido acético e 0,02% de ácido trifluoroacético (TFA). Vários gradientes de fase móvel foram testados com a finalidade de obter a melhor separação entre os analitos.

### **4.2.3 Metodologia para digestão com pepsina**

A metodologia 2 para a identificação da adulteração em leite envolveu precipitação com ácido tricloroacético (TCA), digestão com pepsina e análise em sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo *tandem*, CLAE-EM/EM.

#### **4.2.3.1 Precipitação das proteínas**

A precipitação das proteínas e extração dos analitos foi realizada com TCA na concentração final de 8%, em tubos de centrifuga de 1,5 mL. A curva analítica foi preparada em matriz (leite bovino cru) pela adição de quantidades crescentes da solução de CMP 1,0 mg mL<sup>-1</sup> conforme tabela VI. O volume final foi de 1 mL na qual 500 µL de TCA 24 %

foram adicionados. Os tubos foram colocados em banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugados à 12000 rpm por 10 minutos.

Tabela VI. Preparo da curva analítica utilizada para quantificação no desenvolvimento do método com pepsina.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Volume de leite ( $\mu\text{L}$ )	Volume de padrão ( $\mu\text{L}$ )
0	1000	0
5	995	5
10	990	10
30	970	30
60	940	60
90	910	90

#### 4.2.3.2 Digestão enzimática com pepsina

Após a centrifugação uma alíquota do sobrenadante foi adicionada em *vial* de 1,5 mL para posterior digestão. A glicina ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionada para aumentar o pH e a proporção definida foi de 1:1 (amostra:glicina). A quantidade de enzima foi definida considerando a razão do ponto mais concentrado da curva analítica. O volume de amostra, bem como o tempo mínimo para digestão total foram otimizados (itens 4.2.3.2.1 e 4.2.3.2.2). As concentrações das soluções de pepsina e glicina foram, respectivamente,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

##### 4.2.3.2.1 Otimização do volume de amostra

O volume do extrato utilizado para realização da digestão é muito importante, pois um volume muito pequeno pode interferir na sensibilidade do método, mas também volumes grandes podem ocasionar maior interferência da matriz na ionização dos analitos em CLAE-EM/EM. Experimentos com 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$  de amostras foram testados (Tabela VII).

Tabela VII. Volumes de amostra testados para otimização da resposta dos analitos no espectrômetro de massas.

Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Glicina $1 \text{ mol L}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Pepsina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Volume de água Deionizada ( $\mu\text{L}$ )
50	50	10	890
100	100	20	780
200	200	40	560

#### 4.2.3.2.2 Otimização do tempo de digestão

Para determinar a extensão da digestão, estudos do tempo de incubação foram realizados. Para este experimento, 14 frascos contendo uma solução de CMP  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram adicionados de  $10 \mu\text{L}$  de pepsina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubados á  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da análise. Os diferentes tempos de análise estão descritos na tabela VIII.

Tabela VIII. Otimização do tempo de incubação do caseinomacropéptido (CMP) com pepsina.

Tempo de digestão (horas)						
1	2	3	4	5	6	7
8	10	16	24	36	48	

Concentração das soluções do experimento: CMP ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Pepsina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### 4.2.3.3 Análise dos produtos da digestão com pepsina por CLAE-EM/EM

Para a análise por cromatografia à líquido acoplada a espectrometria de massas, os principais parâmetros de fragmentação foram definidos na digestão teórica por meio de

software específico (SKYLINE). Os parâmetros da espectrometria de massas foram otimizados no modo de ionização *electrospray* positivo (ESI +) utilizando o software Analyst e os peptídeos sintéticos, produtos de digestão com pepsina do CMP e pseudo-CMP. A quantificação foi realizada no modo de MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*), com duas (ou mais) transições: quantificador e qualificador. A fase móvel neste método foi água ultrapura (fase A) e acetonitrila (fase B) ambas com 0,1% de ácido fórmico. Nesta etapa vários gradientes de fase móvel foram testados com a finalidade de obter melhor separação e intensidade dos picos cromatográficos.

#### **4.2.4 Validação da Metodologia utilizando digestão com pepsina**

Nesta etapa foram avaliados os parâmetros de desempenho do método de extração e digestão, tendo como base os critérios de aceitação estabelecidos na Decisão de Comissão de 12 de agosto de 2002 (EC/657/2002).

##### **4.2.4.1 Faixa de Linearidade**

Linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Neste ensaio foi feita uma curva de calibração no intervalo de 1 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

##### **4.2.4.2 Limites de Detecção e de Quantificação**

Neste experimento foi determinado o limite de detecção (LD) do método o qual é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento. Para determinar o limite de quantificação a razão sinal/ruído deverá ser superior a 10 vezes. A determinação do LD e do LQ foi feita utilizando curva do padrão em solvente. O intervalo utilizado foi o mesmo descrito no item 4.2.4.1.

#### **4.2.4.3 Efeito de Matriz**

O efeito de matriz tem o objetivo de verificar a interferência da matriz na resposta do analito, podendo ocasionar supressão ou um aumento da resposta. Sendo assim, três curvas analíticas foram testadas, uma fortificando o padrão de CMP em matriz e efetuando todos os passos definidos para extração (curva recuperado), uma efetuando a fortificação após a extração (*tissue standard*) e por fim a curva do padrão em solvente.

#### **4.2.4.4 Testes de especificidade**

A especificidade tem como objetivo determinar a presença de interferentes que coeluem, ou seja, possuem íon molecular e fragmentação igual aos analitos de interesse. Nesta etapa serão avaliados: brancos de reagentes, brancos de solventes e análise do padrão de CMP sem digestão com o intuito de verificar se ocorre quebra gerando interferentes no tempo de retenção dos peptídeos após digestão.

#### **4.2.4.5 Repetitividade e Reprodutibilidade**

Este ensaio consiste na análise de sete replicatas de amostras de leite fortificadas na concentração do Limite máximo permitido (LM), na metade e 1,5 vezes o LM. A repetitividade e a reprodutibilidade são verificadas pelo cálculo dos coeficientes de variação das replicatas no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. A Tabela IX apresenta um resumo do procedimento. A partir destes dados serão determinados a repetitividade e reprodutibilidade, bem como exatidão e precisão do método.



Tabela IX. Avaliação da repetitividade, reprodutibilidade, exatidão e precisão do método de digestão com pepsina.

<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
Curva analítica	Curva analítica	Curva analítica
7 replicatas 0,5 x LM	7 replicatas 0,5 x LM	7 replicatas 0,5 x LM
7 replicatas 1,0 x LM	7 replicatas 1,0 x LM	7 replicatas 1,0 x LM
7 replicatas 1,5 x LM	7 replicatas 1,5 x LM	7 replicatas 1,5 x LM

LM= 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Limite máximo estabelecido na Instrução Normativa nº68 de 2006).

#### **4.2.4.6 Testes de incubação de *Pseudomonas fluorescens* em leite**

Como não existe nenhum padrão de pseudo-CMP disponível para aquisição, testes de incubação da bactéria em leite, com o intuito de produzir pseudo-CMP no próprio laboratório, foram realizados. As amostras de leite incubadas foram analisadas conforme método desenvolvido para digestão com pepsina.

#### **4.2.4.7 Análise de amostras reais**

Neste ensaio foram selecionadas algumas amostras do programa de combate à fraude do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento as quais foram analisadas conforme Instrução Normativa nº 68. Também foram analisadas amostras de leite cru obtidas de diversos produtores de leite do Rio Grande do Sul e de outros estados.

#### **4.2.5 Equipamentos**

O equipamento utilizado no desenvolvimento de ambas as metodologias, para análise dos produtos da digestão, foi um sistema CLAE-EM/EM modelo API 5000, marca Applied

Biosystems/MDS SCIEX (Foster City, CA, USA) acoplado a um cromatógrafo líquido 1100 Series da marca Agilent Technologies. Para o tratamento dos dados foi utilizado o software Analyst (Applied Biosystems).

Na validação do método de extração utilizando ultrassom foi utilizado um cromatógrafo à líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com amostrador automático (SIL-HTc), bomba quaternária (LC-20AT) e com detector de arranjo de diodos.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1. METODOLOGIA PARA DIGESTÃO COM TRIPSINA**

#### **5.1.1. Precipitação utilizando banho de ultrassom**

A metodologia atualmente utilizada pelo MAPA faz uso da precipitação das proteínas com adição de TCA por gotejamento sob agitação magnética. As principais limitações deste método são o uso de bureta e a velocidade de gotejamento, pois o analito pode precipitar junto com a massa protéica. Além disso, as amostras devem ser precipitadas uma a uma e filtradas após 1 hora de repouso. A utilização de banho de ultrassom permite a adição de TCA sem gotejamento e as amostras são colocadas em banho de ultrassom para que ocorra a desagregação, facilitando a transferência do analito da massa protéica precipitada para o sobrenadante. A tabela X apresenta os resultados obtidos.

A avaliação de desempenho do método de extração proposto foi realizada por comparação com o método oficial de análise (IN 68, 2006), que utiliza a técnica CLAE-CEM-DAD. O método de extração proposto apresentou coeficientes de variação dentro dos parâmetros de aceitabilidade (EC/657/2002) para este nível de concentração (variação < 15%). Além disso, a sobreposição das curvas analíticas evidencia que não há diferença significativa entre os dois métodos (Figura 7).

Entretanto, para confirmar que não há diferença significativa, tanto o coeficiente linear quanto o coeficiente angular do método proposto (MUS) não devem diferir significativamente dos coeficientes da regressão da curva do método oficial (MO). A tabela XI apresenta os resultados do teste de igualdade entre os interceptos e entre as inclinações. A hipótese nula, ou seja, de que há igualdade entre os coeficientes, foi verificada através do teste-t. Se  $t$  calculado for menor que  $t$  crítico, com 95% de confiança, a hipótese nula é aceita.

Tabela X. Resultados da avaliação de desempenho do método utilizando banho de ultrassom na extração (MUS) em comparação ao método oficial (MO).

Método de extração	Ponto da Curva ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área	Concentração calculada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Média	DPR %	CV %
MO	0	0,00	0,00			
MO	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MO	25	895104	29,33			
MO	25	883134	28,83	29,08	0,35	1,21
MO	50	1458116	52,79			
MO	50	1447467	52,35	52,57	0,31	0,60
MO	75	2045389	77,26			
MO	75	2044768	77,24	77,25	0,02	0,02
MO	100	2644146	102,21			
MO	100	2640284	102,05	102,13	0,11	0,11
MO	200	4918546	196,99			
MO	200	4916147	196,9	196,94	0,07	0,04
MUS	0	0,00	0,00			
MUS	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MUS	25	854167	30,51			
MUS	25	848974	30,29	30,40	0,16	0,52
MUS	50	1403370	53,94			
MUS	50	1400436	53,81	53,88	0,09	0,16
MUS	75	1989788	78,96			
MUS	75	1984606	78,74	78,85	0,16	0,20
MUS	100	2288314	91,69			
MUS	100	2292651	91,88	91,78	0,13	0,14
MUS	200	4849953	200,97			
MUS	200	4852368	201,08	201,02	0,07	0,04

CV = coeficiente de variação; DPR = Desvio Padrão Relativo.

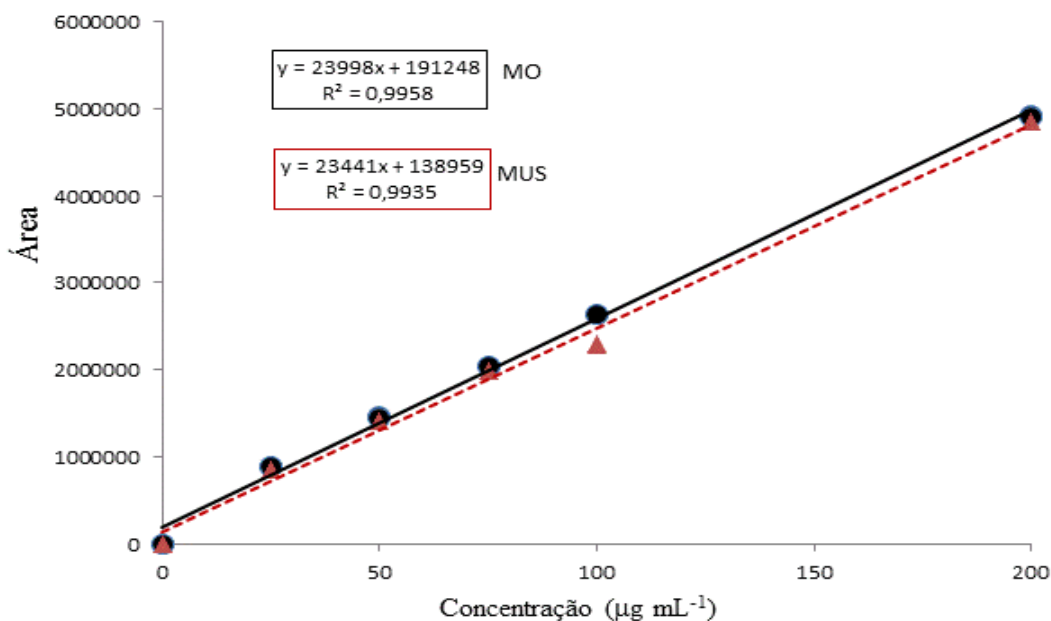


Figura 7. Curva analítica do caseinomacropéptido (CMP) em matriz (leite cru): MO = método oficial de extração; MUS = método de extração utilizando banho de ultrassom.

Tabela XI. Resultados do teste-t, com 95% de confiança, para similaridade entre as curvas analíticas do método oficial (MO) e do método utilizando banho de ultrassom (MUS).

Método		Coefficientes	<i>t</i> calculado	<i>t</i> crítico ( $\alpha/2$ )
MO	Coeficiente linear	191247	0,681	2,086
MUS		138959		
MO	Coeficiente angular	23997	0,718	2,101
MUS		23441		

Condição para similaridade: Se  $t$  calculado <  $t$  crítico

A análise estatística para verificação de similaridade entre as duas curvas analíticas mostrou que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares e lineares. O teste-t apresentou  $t$  calculado menor que  $t$  crítico condição necessária para que a hipótese nula, de que os coeficientes são iguais, não seja rejeitada. A partir deste teste pode-se concluir que o novo método de extração é eficiente e que não há diferença significativa entre as curvas.

Para a avaliação de desempenho do método foram realizados testes de repetitividade e reprodutibilidade. A tabela XII apresenta os resultados desta avaliação, mostrando que o método de extração proposto é tão eficiente quanto o utilizado pelo MAPA, pois os coeficientes de correlação mostram uma resposta linear na faixa de concentração estudada e os coeficientes de variação (CV) das replicatas dos lotes estão dentro dos limites aceitáveis (CV < 16% Inter dia e CV < 10% Intra dia), utilizando como referência os critérios de aceitabilidade do guia de validação da EC/657/2002 para esta faixa de concentração. Sendo assim, o método utilizando banho de ultrassom é uma alternativa rápida e prática, ao método oficial. Variou-se também o analista (Dia 3) para avaliar a robustez do método. Os dados brutos encontram-se descritos no Anexo IV.

Tabela XII. Resultados da avaliação de desempenho do método utilizando banho de ultrassom na extração de caseinomacropéptido (CMP) em leite bovino.

<b>Curva analítica</b>	<b>Coefficiente angular</b>	<b>Intercepto</b>	<b>Coefficiente de determinação (R<sup>2</sup> &gt; 0,97)</b>	
<b>Dia 1 (A1)</b>	<b>1,91E+04</b>	<b>93212</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0,9930</b>	
<b>Dia 2 (A1)</b>	<b>2,08E+04</b>	<b>44554</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0,9857</b>	
<b>Dia 3 (A2)</b>	<b>2,28E+04</b>	<b>38761</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0,9990</b>	
<b>Nível de Fortificação</b>	<b>Média Global (área)</b>	<b>CV % Intra Dia (CV&lt;10)</b>	<b>CV % Inter Dia (CV&lt;16)</b>	<b>Precisão Intermediária %</b>
<b>15 µg mL<sup>-1</sup></b>	<b>460243,0</b>	<b>5,4</b>	<b>1,1</b>	<b>5,5</b>
<b>30 µg mL<sup>-1</sup></b>	<b>749452,6</b>	<b>4,6</b>	<b>3,0</b>	<b>5,4</b>
<b>45 µg mL<sup>-1</sup></b>	<b>1006475,1</b>	<b>6,8</b>	<b>2,2</b>	<b>7,1</b>

CV = Coeficiente de variação; A1 = analista 1; A2 = analista 2

Pontos da curva: 0, 25, 50, 75, 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>

### 5.1.2. Extração em fase sólida (EFS) para digestão com tripsina

A eficiência da digestão com tripsina está diretamente relacionada com o pH, tendo seu ponto ótimo em pH próximo a 8,0. Entretanto, a precipitação das proteínas e extração dos analitos no leite foi realizada com TCA que possui pH entre 1,0 e 2,0.

O método oficial de determinação do índice de CMP em leite do Ministério da Agricultura (IN 07, 2010) utiliza a coleta de frações correspondente ao pico do CMP e posterior digestão. Neste método a fração coletada está em fase móvel tampão fosfato (pH 6,0), sendo necessário ainda o ajuste de pH para 8,0. Porém, como o volume de injeção é pequeno (100  $\mu\text{L}$ ), a concentração dos analitos no extrato coletado é muito baixa e isso compromete a detecção em amostras próximas ao primeiro ponto da curva. Uma alternativa seria a evaporação do solvente das amostras em concentradores a vácuo ou a utilização de cartuchos de extração em fase sólida para purificação, mudança de solvente e concentração dos analitos.

A mudança de solvente é um ponto crítico no método utilizado pelo MAPA. Sendo assim, a proposta neste estudo foi utilizar a extração em fase sólida (EFS) para purificação e concentração dos analitos em substituição à coleta das frações. Volumes de 1, 2, 3 e 4 mL de amostra foram testados. A recuperação máxima foi obtida com 2 mL, sendo este o volume escolhido para as análises. Valores acima seriam melhores, pois aumentariam a concentração dos analitos e sensibilidade do método, entretanto, houve saturação do cartucho.

O tempo de coleta das frações também foi um problema, sendo que para cada amostra acima do limite ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) são coletadas no mínimo três frações da amostra e de cada ponto da curva analítica. Como o tempo de análise é de 20 minutos e para uma única amostra seriam necessárias 21 frações resultando em um tempo total de sete horas. Além disso, é necessário que o analista permaneça em frente ao equipamento esperando o momento certo de cada coleta. Sendo assim, considerando o tempo gasto para a análise de uma amostra pelo método de coleta de frações (7 horas), utilizando EFS poderia ser feita, na metade deste tempo, a análise de 6 amostras. Portanto, o método de EFS pode ser uma alternativa ao método de coleta de frações.

O protocolo de extração em fase sólida escolhido está descrito na Figura 8, sendo que a condição proposta pelo fabricante apresentou melhores resultados em comparação às outras condições.

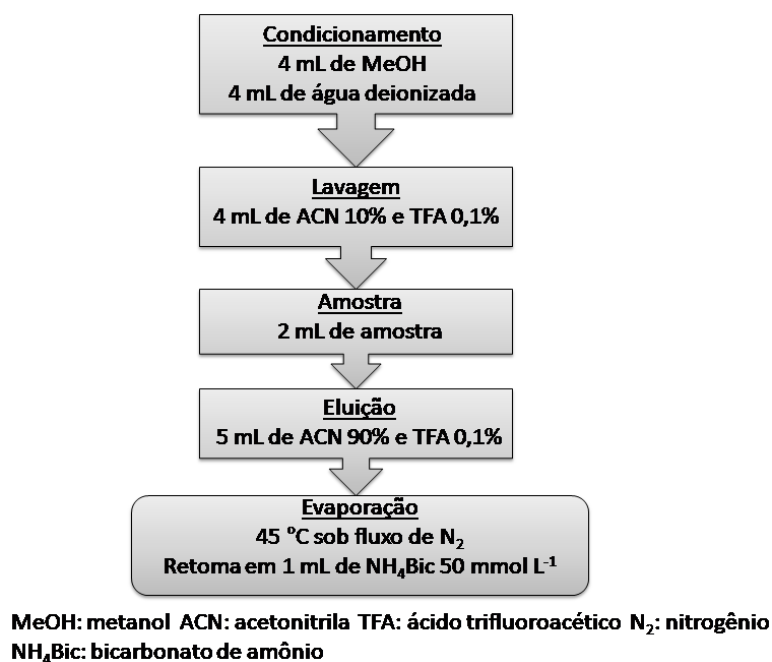


Figura 8. Protocolo de extração em fase sólida para purificação e concentração dos analitos. Todos os testes foram realizados com padrão de caseinomacropéptideo (CMP) em solvente (água deionizada) na concentração de 30 µg mL<sup>-1</sup>.

### 5.1.3. Parâmetros de espectrometria de massa – digestão com tripsina

A estrutura do CMP e do pseudo-CMP, é apresentada na Figura 9, bem como a diferenciação no que diz respeito à digestão com tripsina. Os peptídeos gerados se diferenciam na presença (CMP) ou na ausência (pseudo-CMP) do aminoácido N-terminal metionina (M). No caso da utilização da enzima tripsina deve-se levar em conta a digestão parcial ou completa, na qual são gerados peptídeos com duas (KK) ou uma lisina (K), respectivamente. Para o peptídeo com uma lisina a digestão é dita como completa e para o peptídeo com uma lisina, digestão parcial.



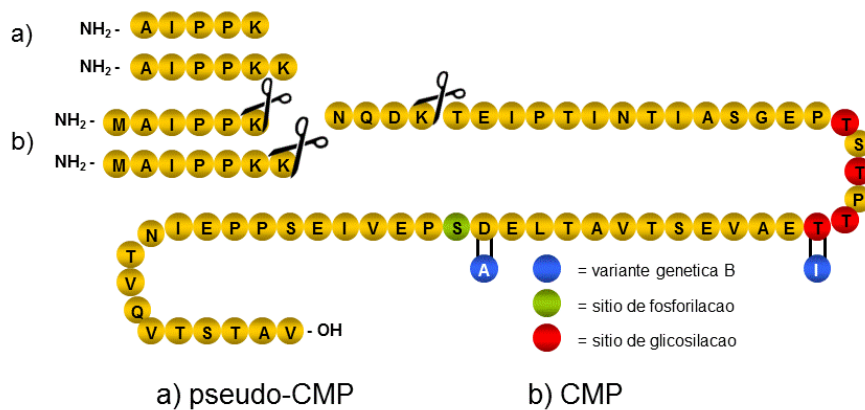


Figura 9: Estrutura do CMP e pseudo-CMP e os pontos de clivagem da tripsina (tesouras). Clivagem total ocorre entre os aminoácidos lisina (K-K) e a clivagem parcial entre os aminoácidos lisina e (K-N).

A utilização de peptídeos sintéticos foi importante na identificação e escolha dos parâmetros da espectrometria de massas. Através da infusão, foram selecionados os íons moleculares que apresentaram maior intensidade e efetuada a fragmentação destes íons. Com o auxílio do software Analyst os parâmetros e a seleção dos fragmentos mais intensos foram otimizados. Após, a otimização da fonte de ionização foi feita, dois peptídeos apresentaram melhor ionização, um para análise de CMP e outro para a análise de pseudo-CMP. A descrição dos parâmetros otimizados encontra-se no Anexo II. As Tabela XIII e XIV apresentam, respectivamente, os resultado da otimização dos parâmetros da fonte de ionização e da fragmentação dos íons selecionados.

Tabela XIII. Parâmetros da ionização por *electrospray* no modo positivo para digestão com tripsina.

Parâmetro	Valor
Potencial de Entrada (EP)	10 Volts
Gás de Colisão (CAD)	10 Volts
Gás de cortina (CUR)	10 psi
Gás de Nebulização (GS1)	55 psi
Gás Auxiliar (GS2)	50 psi
Voltagem do Spray Eletrônico	5500 Volts
Temperatura, (TEM)	650 °C

Tabela XIV. Parâmetros otimizados para análise no espectrômetro de massas dos peptídeos sintéticos por ionização no modo positivo para digestão com tripsina.

Analito	Íon	Q1	Q3	DP	CXP	CE
MAIPPKK	$[M+2H]^{2+}$	392,8	175,1	76	24	29
			226,2	76	32	32
			235,3	41	18	15
AIPPK	$[M+2H]^{2+}$	263,3	157,1	36	22	15
			185,1	36	26	11
			341,0	36	26	13

DP = *declustering potential*; CXP = *collision cell exit potential*; CE = *collision energy*;  
Unidade: Volt

A escolha dos íons moleculares, bem como a dos seus fragmentos, foi baseada na intensidade ou eficiência da ionização, ou seja, foram os íons que apresentaram melhor resposta.

#### 5.1.4. Cromatografia Líquida – digestão com tripsina

Definidos os parâmetros do analisador de massas, o próximo passo foi estabelecer as condições para a separação cromatográfica. O gradiente de fase móvel estabelecido está descrito na Tabela XV. Com este gradiente houve separação dos picos cromatográficos, sendo mais um fator de seletividade do método desenvolvido. A Figura 10 mostra o cromatograma dos peptídeos sintéticos em solvente (fase móvel A).

Tabela XV: Gradiente de fase móvel utilizado na separação cromatográfica.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase A %</b>	<b>Fase B %</b>	<b>Fluxo (µL)</b>
<b>3,00*</b>	90	10	500
<b>0,00</b>	90	10	500
<b>2,00</b>	90	10	500
<b>8,00</b>	50	50	500
<b>9,00</b>	50	50	500
<b>12,00</b>	90	10	500
<b>15,00</b>	90	10	750
<b>23,00</b>	90	10	750

\*Tempo de equilíbrio antes de cada injeção. Fase A: Água - Fase B: Acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido acético e 0,02% de ácido trifluoroacético.

A separação dos picos se fez necessária, pois como os peptídeos da digestão com tripsina são pequenos (6 aas) e diferem somente no aminoácido metionina, a possibilidade de fragmentação na fonte não pode ser descartada. Testes de injeção individual de cada peptídeo identificaram que ocorria perda do aminoácido metionina e isso geraria resultados falsos uma vez que CMP pode se transformar em pseudo-CMP antes da câmara de colisão gerando fragmentos semelhantes. Com a separação na coluna cromatográfica, a identidade do peptídeo é inequívoca (Figura 10).

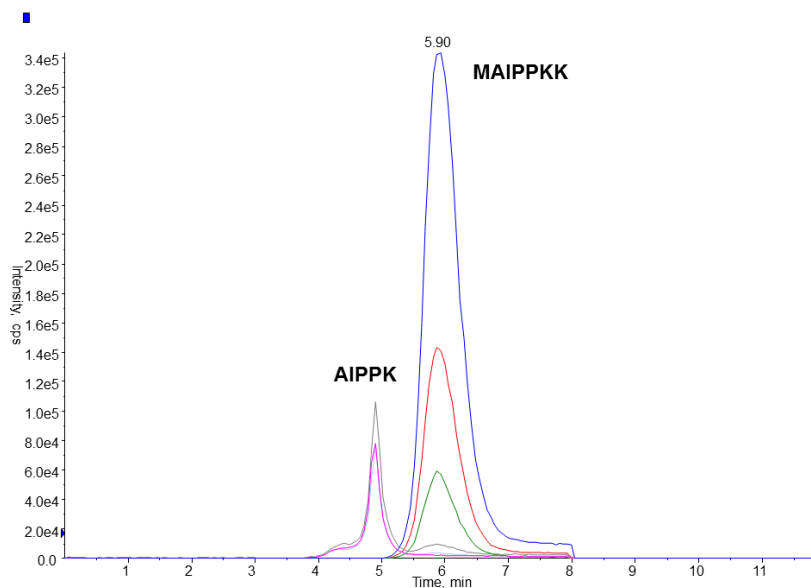


Figura 10: Cromatograma dos peptídeos sintéticos em solvente (fase móvel A), da digestão tríptica do pseudo-CMP (AIPPK) e do CMP (MAIPPKK).

A Figura 10 apresenta o cromatograma dos peptídeos sintéticos em solvente (fase móvel A). Ambos estão na mesma concentração, mas apresentam respostas diferentes no que diz respeito à ionização. O AIPPK, produto da digestão completa do pseudo-CMP, elui primeiro devido ao fato de possuir menos sítios de interação com a fase estacionária.

As Figuras 11A e 11B mostram os produtos da digestão tríptica do padrão de CMP em solvente e em matriz, sendo que a digestão em solvente não passa pelo processo de EFS como ocorre na digestão em matriz. Neste estudo também foram analisadas algumas amostras reais para fins de confirmação da eficiência do método em diferenciar contaminação bacteriana da adição de soro de queijo no leite (Figuras 12A e 12B).

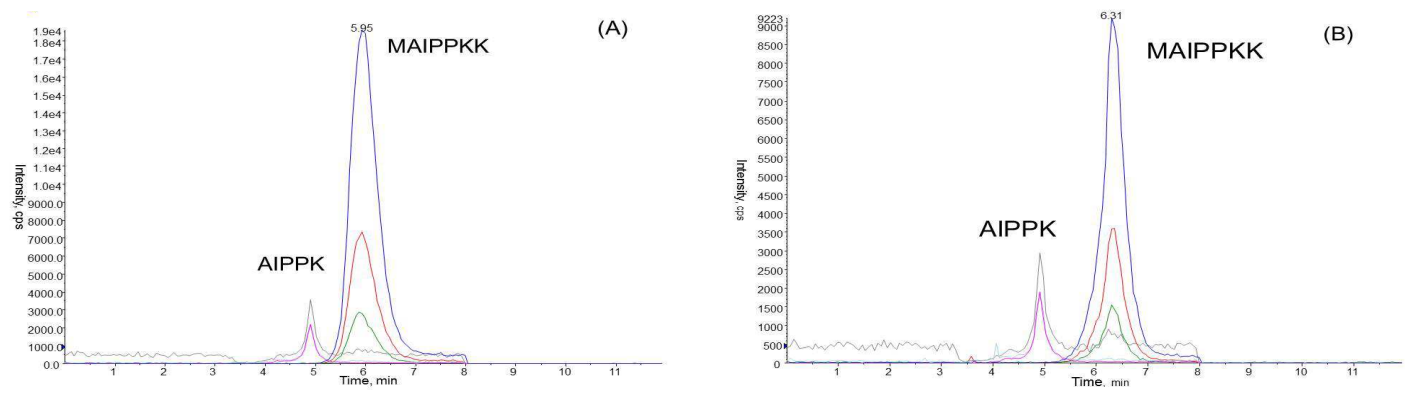


Figura 11: Cromatogramas do padrão de CMP após digestão com tripsina. (A) Digestão do padrão em solvente e (B) digestão em matriz.

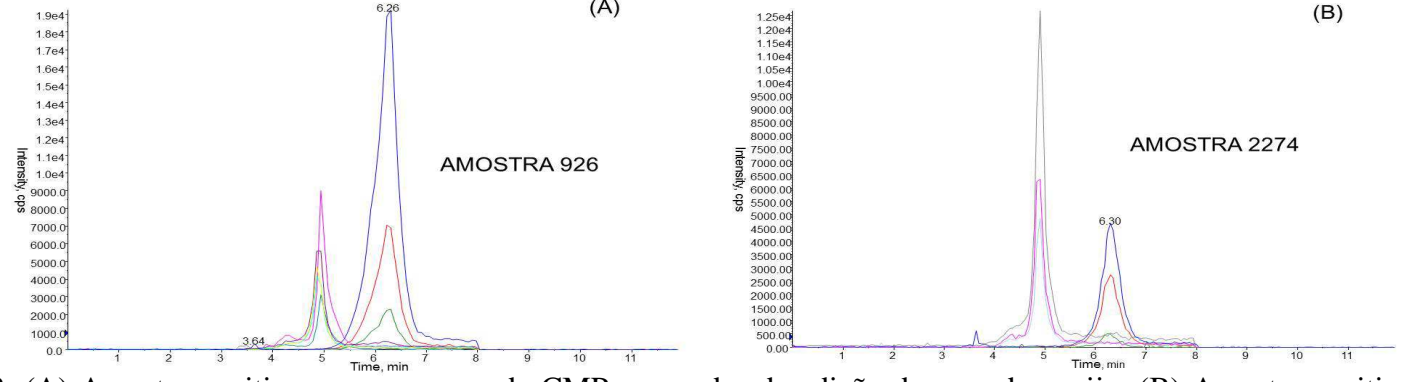


Figura 12: (A) Amostra positiva para presença de CMP, marcador da adição de soro de queijo. (B) Amostra positiva para contaminação por *Pseudomonas fluorescens*.

Nas Figuras 11A e 11B é possível observar a diferença na resposta, mostrando que quando o padrão é adicionado na matriz e passa pelo processo extrativo (figura 11B) a recuperação é baixa. Entretanto, como nas análises optou-se por utilizar curva em matriz e todas as amostras passam pelo mesmo processo, a recuperação não irá prejudicar os resultados, desde que a sensibilidade da técnica permita distinguir com clareza os picos cromatográficos.

As Figuras 12A e 12B apresentam os cromatogramas de duas amostras que apresentaram os peptídeos marcadores, na qual pode ser identificada na figura 12A a presença predominante do peptídeo (AIPPK) oriundo da contaminação do leite por *Pseudomonas fluorescens*. Na figura 12B, a detecção do peptídeo da digestão do CMP (MAIPPKK) comprova que a amostra contém o marcador da adição de soro de queijo em concentração alta, portanto considerada positiva para fraude.

A Figura 13 apresenta as curvas analíticas de CMP em solvente e em matriz após digestão com tripsina. A matriz neste caso apresentou influência na resposta do analito. A escolha por curvas analíticas em matriz se faz necessária, quando há influência desta, para análises de quantificação.

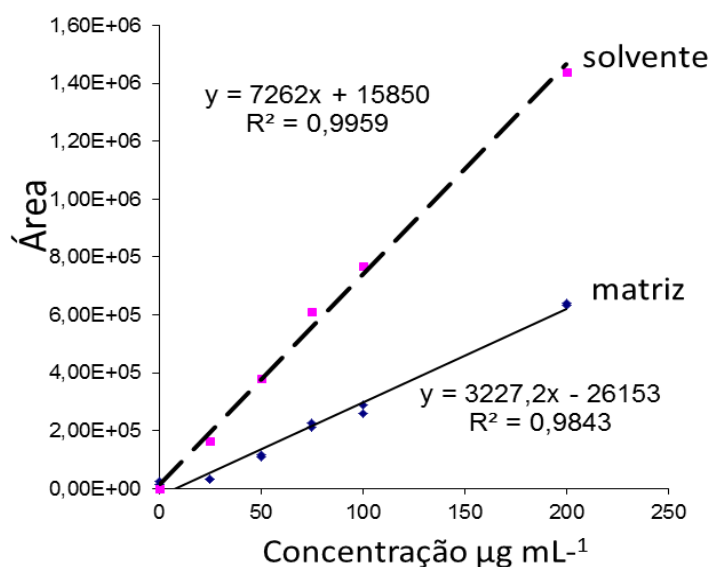


Figura 13: Curva analítica de CMP em solvente e em matriz, após digestão com tripsina.

Além do efeito de matriz, ocorrem perdas na etapa de EFS e este é mais um fator para a utilização de curva em matriz, assim as amostras e a curva passam pelo mesmo processo, o que elimina a necessidade de se aplicar um ou mais fatores de correção aos resultados quantitativos.

## 5.2. METODOLOGIA PARA DIGESTÃO COM PEPSINA

### 5.2.1. Digestão com pepsina

A pepsina é uma enzima que tem atividade máxima na digestão de proteínas e peptídeos em pH ácido (próximo a 2,5), sendo o emprego desta uma alternativa muito interessante para a análise de CMP, uma vez que não há a necessidade da troca de solvente como no método com tripsina, a qual é totalmente inativa em pH ácido. A digestão foi realizada após precipitação com TCA, necessitando apenas um ajuste do pH 1,5 para pH 2,5. Este ajuste foi realizado com adição de volumes equivalentes de glicina 1 mol L<sup>-1</sup> ao volume do extrato.

O ponto de clivagem desta enzima é diferente da tripsina fornecendo um peptídeo de maior massa molecular e, portanto, mais específico (Figura 14). De modo similar à tripsina, a digestão com pepsina exclui todos os pontos de variação genética (A e B) e os sítios de fosforilação e glicosilação.

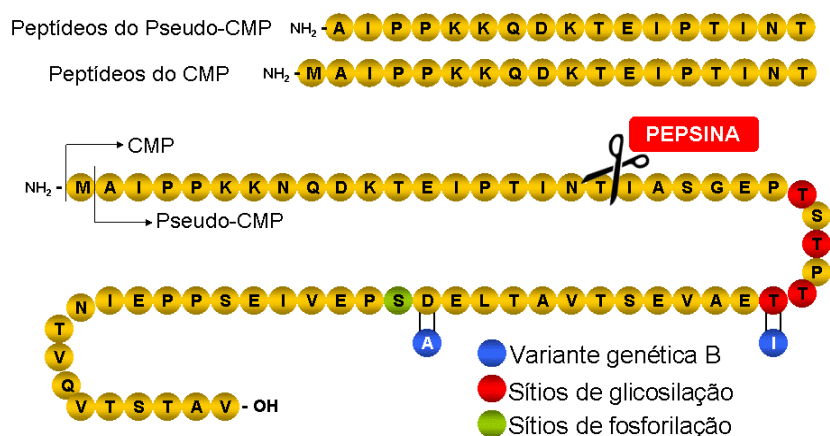


Figura 14: Estrutura do CMP e pseudo-CMP indicando o ponto de clivagem da pepsina.

### 5.2.2. Parâmetros de espectrometria de massa – digestão com pepsina

Os parâmetros definidos para os peptídeos sintéticos da digestão com pepsina (Tabela XVI e XVII) foram obtidos na etapa de infusão dos analitos e otimização usando FIA (*flow injection analysis*, ver anexo II) os quais são otimizados automaticamente pelo software Analyst.

Tabela XVI. Parâmetros para a ionização por *eletrospray* no modo positivo para digestão com pepsina.

Parâmetro	Valor
Potencial de Entrada (EP)	10 Volts
Gás de Colisão (CAD)	12 Volts
Gás de cortina (CUR)	10 Volts
Gás de Nebulização (GS1)	45 psi
Gás Auxiliar (GS2)	55 psi
Voltagem do Spray Eletrônico	5500 Volts
Temperatura, °C (TEM)	650 °C

Tabela XVII. Parâmetros do espectrômetro de massas para análise dos peptídeos da digestão com pepsina e ionização no modo positivo.

Analito	Íon	Q1	Q3	DP	CXP	CE
MAI-INT	[M+3H] <sup>3+</sup>	713,8	797,9	120	27	24
			896,9	120	27	24
			953,5	120	27	24
AI-INT	[M+3H] <sup>3+</sup>	670,0	732,4	120	27	24
			888,4	120	27	24
			912,4	120	27	24

DP = *declustering potential*; CXP = *collision cell exit potential*; CE = *collision energy*; unidade: Volt (V)



Para otimizar a separação cromatográfica foram utilizados os peptídeos sintéticos MAI-INT e AI-INT. O gradiente que apresentou melhor relação sinal/ruído e picos cromatográficos mais intensos está descrito na Tabela XVIII. Com este gradiente não houve separação dos picos, mas testes com a injeção individual de cada peptídeo não apresentaram picos interferentes, nem a fragmentação na fonte de ionização. Sendo assim, a coeluição dos picos não irá comprometer os resultados.

Tabela XVIII: Gradiente de fase móvel utilizado na cromatografia líquida para análise dos peptídeos da digestão com pepsina.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase A %</b>	<b>Fase B %</b>	<b>Fluxo (µL)</b>
<b>2,00*</b>	90	10	600
<b>0,00</b>	90	10	600
<b>2,00</b>	90	10	600
<b>5,00</b>	40	60	600
<b>10,00</b>	40	60	600
<b>12,00</b>	90	10	600
<b>15,00</b>	90	10	600

\*Tempo de equilíbrio. Fase A: Água - Fase B: Acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido fórmico.

### **5.2.3. Otimização do volume de amostra**

A Figura 15 apresenta os resultados da determinação do volume de amostra para realização da digestão com pepsina. O volume de 200 µL de amostra foi definido, pois nestas condições as respostas foram consideradas satisfatórias e volumes maiores podem aumentar o efeito matriz na análise por espectrometria podem mascarar os resultados.

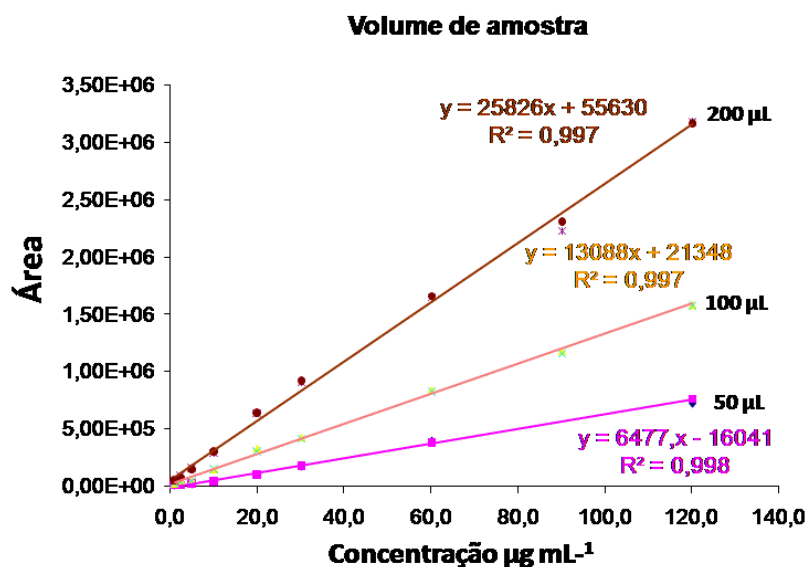


Figura 15: Curva dos dados obtidos para a otimização do volume de amostra na digestão com pepsina.

#### 5.2.4. Otimização do tempo de digestão

A otimização do tempo de digestão avaliou a resposta da digestão de CMP (30 mg mL<sup>-1</sup>) com pepsina *versus* o tempo de incubação. Neste experimento manteve-se a temperatura em 37 °C. A figura 16 apresenta os resultados de 1 a 48 h de incubação, tendo um aumento na resposta para os tempos de 1 a 4 h, caindo em 5 h e mantendo-se até 24 h. O experimento foi realizado até 48 horas para verificação do comportamento da reação. Entretanto, após 16 h se torna muito dispendioso, uma vez que em análises de rotina se busca maior rapidez na emissão dos resultados.

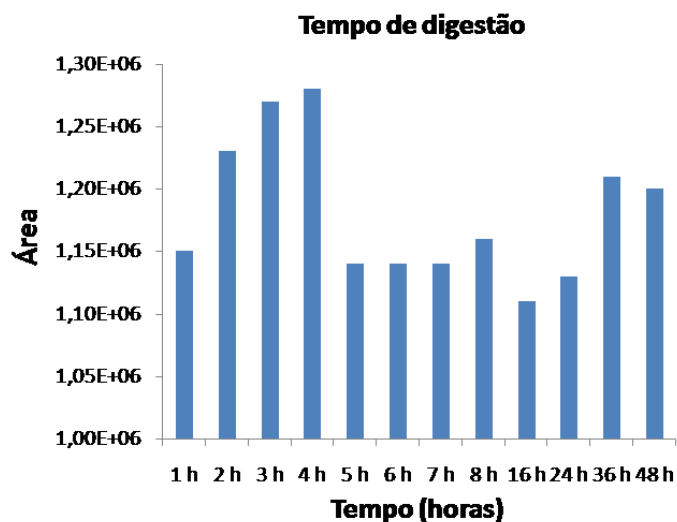


Figura 16: Otimização do tempo de digestão de caseinomacropéptido (CMP 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com pepsina.

### 5.2.5. Validação da Metodologia utilizando digestão com pepsina

A validação da metodologia utilizando digestão com pepsina apresentou resultados satisfatórios, tendo como base os critérios de aceitação estabelecidos na Decisão de Comissão de 12 de agosto de 2002 (EC/657/2002).

#### 5.2.5.1. Faixa de Linearidade, Limite de Detecção e de Limite de Quantificação

A Figura 17 apresenta as curvas analíticas dos peptídeos sintéticos em solvente na faixa de concentração de 1 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Neste intervalo os coeficientes de determinação apresentaram valores satisfatórios de linearidade para os dois peptídeos ( $R^2 > 0,99$ ).

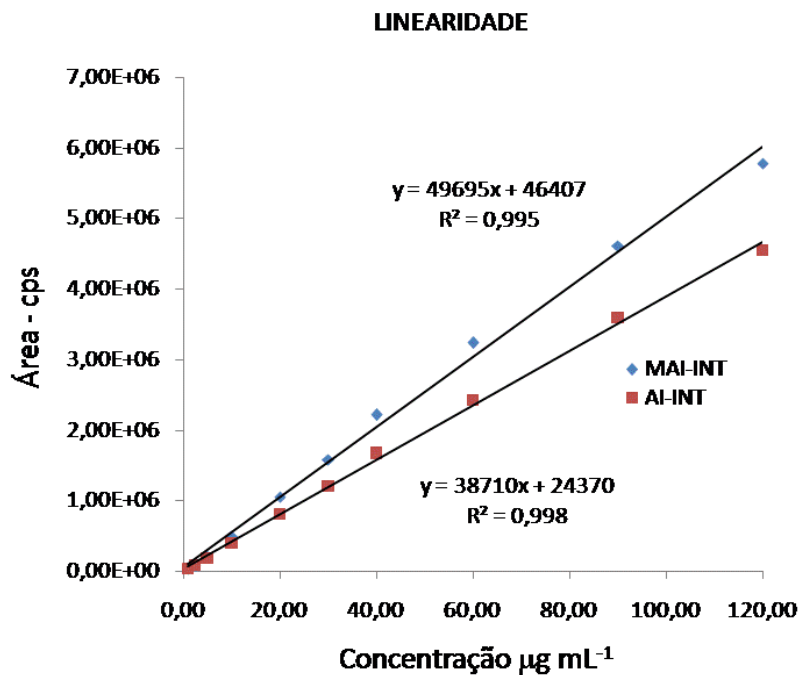


Figura 17: Curva analítica em solvente (água deionizada com 0,1% de ácido fórmico) dos peptídeos sintéticos da digestão com pepsina.

Para a determinação dos limites de detecção e de quantificação a mesma curva do ensaio de linearidade foi utilizada. Tendo o ponto 30 µg mL<sup>-1</sup> como limite máximo permitido, o limite de detecção (LD) foi o primeiro ponto da curva 1 µg mL<sup>-1</sup> e o limite de quantificação (LQ) o ponto de concentração 5 µg mL<sup>-1</sup>. A relação sinal/ruído deve ser de 3 vezes para o LD e de 10 vezes para LQ. A Figura 18 (A a D) mostra os cromatogramas do LD e LQ para os dois peptídeos (MAI-INT e AI-INT) e os respectivos valores da relação sinal/ruído. A tabela XIX apresenta os resultados dos ensaios de linearidade e a tabela XX os resultados de LD e LQ.

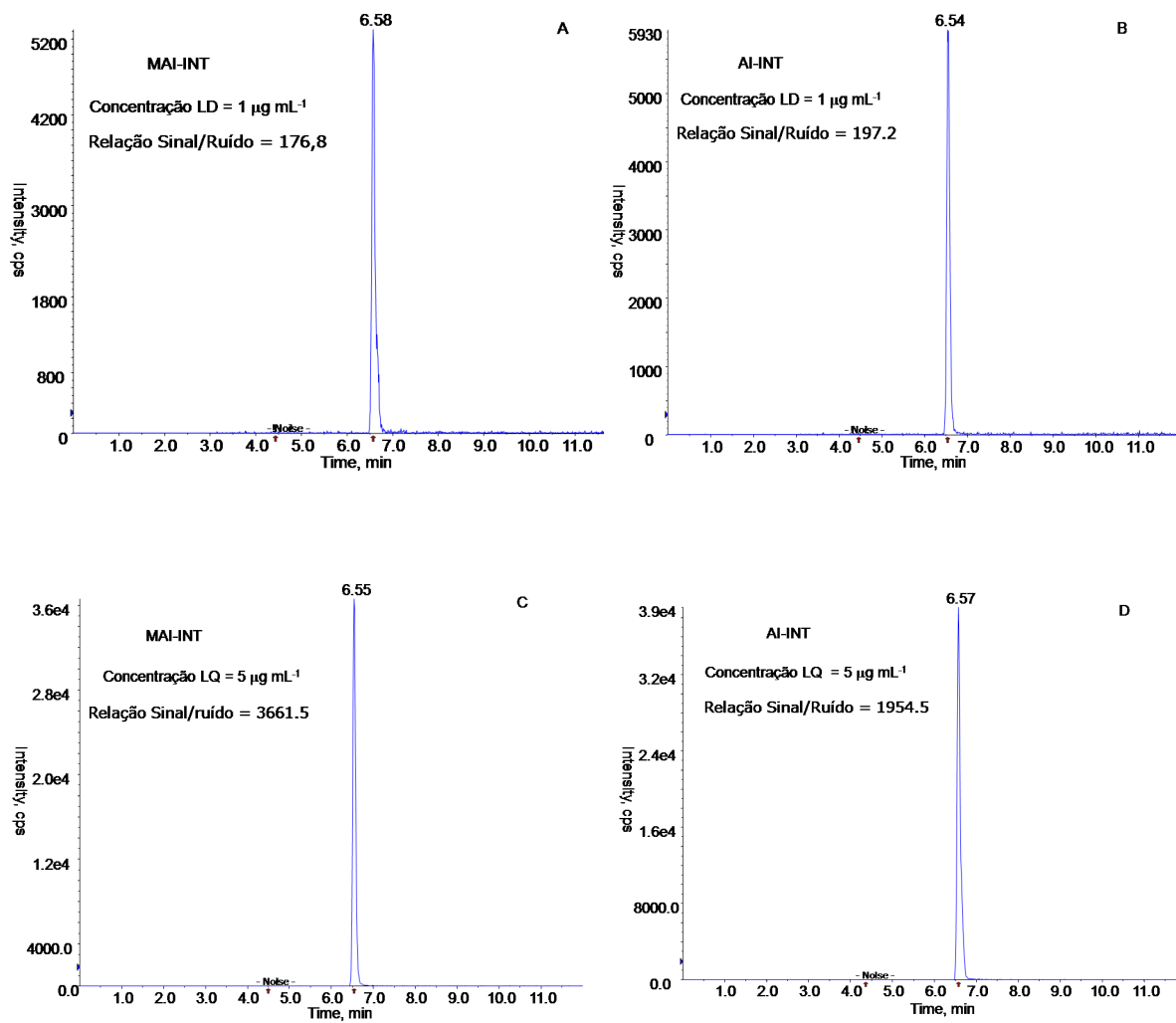


Figura 18: Cromatogramas do primeiro ponto da curva 1 µg mL<sup>-1</sup> da curva e do terceiro ponto de concentração 5 µg mL<sup>-1</sup>, referentes aos Limite de Detecção (A e B) e de Quantificação (C e D), respectivamente.

Tabela XIX: Resumo dos resultados dos ensaios de linearidade determinados pela curva analítica dos peptídeos sintéticos.

Curva analítica	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> > 0,99)
AI-INT	3,87E+04	24370	R <sup>2</sup> = 0,9980
MAI-INT	4,96E+04	46407	R <sup>2</sup> = 0,9950

Tabela XX. Resumo dos resultados dos limites de detecção e de quantificação, determinados pela curva analítica dos peptídeos sintéticos.

	AI-INT	MAI-INT
<b>Relação sinal/ruído 1 mg mL<sup>-1</sup></b>	197	176
<b>Relação sinal/ruído 5 mg mL<sup>-1</sup></b>	3661	1954
<b>Limite de Detecção (LD)</b>	1 µg mL <sup>-1</sup>	1 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Limite de Quantificação (LQ)</b>	5 µg mL <sup>-1</sup>	5 µg mL <sup>-1</sup>

Critério: LD relação sinal/ruído > 3; LQ relação sinal/ruído > 10

### 5.2.5.2. Efeito de Matriz

A Figura 19 apresenta as três curvas analíticas mostrando que há interferência da matriz na resposta do analito, podendo ocasionar supressão ou um aumento da resposta. Sendo assim, na curva matriz (recuperado) a fortificando do padrão de CMP é feita antes da extração, na curva *Tissue Standard* (TS) a fortificação é feita no extrato da matriz, ou seja, o padrão não passa pelo processo da extração e por fim a curva do padrão em solvente (água deionizada com 0,1% de ácido fórmico). Neste experimento, foi possível observar que a curva em matriz apresenta uma inclinação menor que as curvas em solvente e TS, que são bem próximas, isso se deve a perdas no processo de extração, pois o método apresenta recuperações em torno de 55 %.

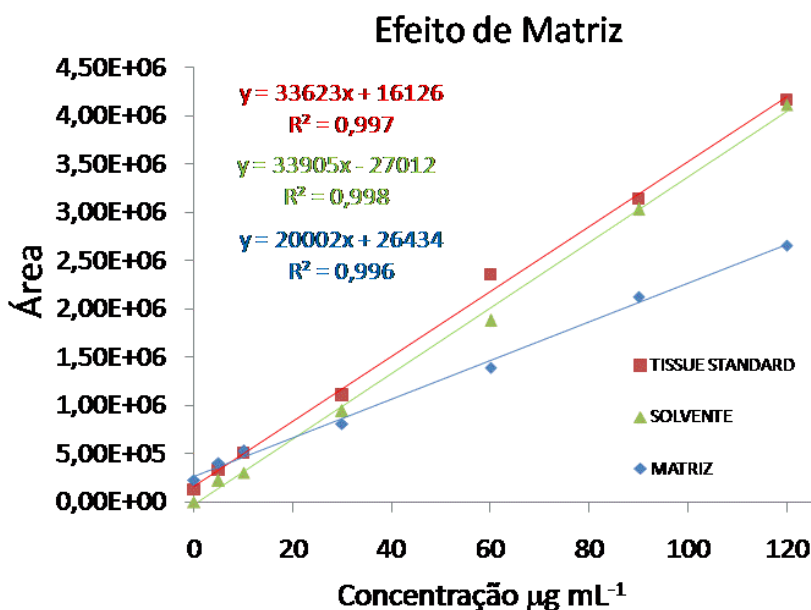


Figura 19: Curva analítica da digestão com pepsina do caseinomacropeptídeo (CMP) para identificação do efeito de matriz. Curva em solvente (água deionizada com 0,1% de ácido fórmico), em matriz (adicionado antes da extração) e em *tissue standard* (padrão adicionado após a extração). Faixa de concentração 1 a 120 µg mL<sup>-1</sup>.

### 5.2.5.3. Testes de especificidade

A Figura 20 apresenta o cromatograma do padrão de CMP sem digestão com pepsina. A presença dos fragmentos pode ser verificada na análise do CMP sem digestão, entretanto a concentração é muito baixa, não interferindo na quantificação. No branco de reagente, ou seja, sem adição do padrão de CMP (Figura 21), não foi verificado a presença de picos interferentes no mesmo tempo de retenção.

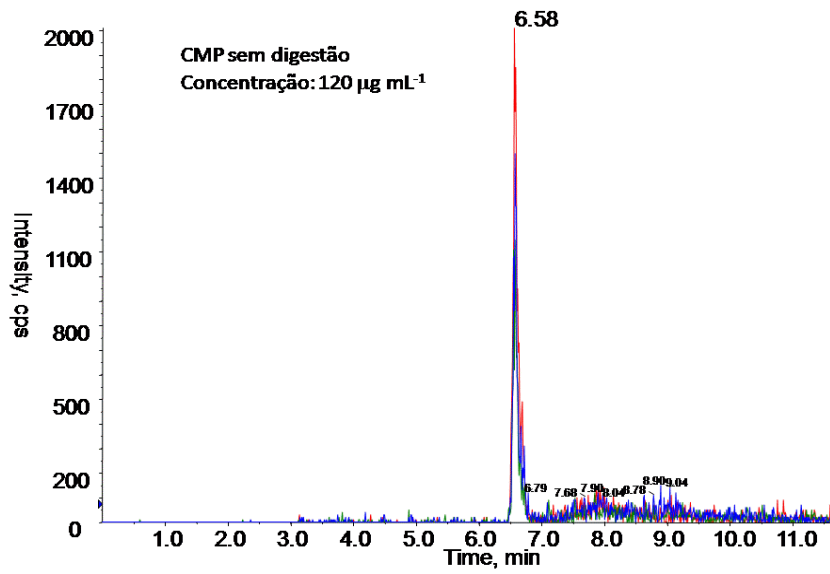


Figura 20: Padrão de caseinomacropeptídeo (CMP) sem digestão com pepsina.

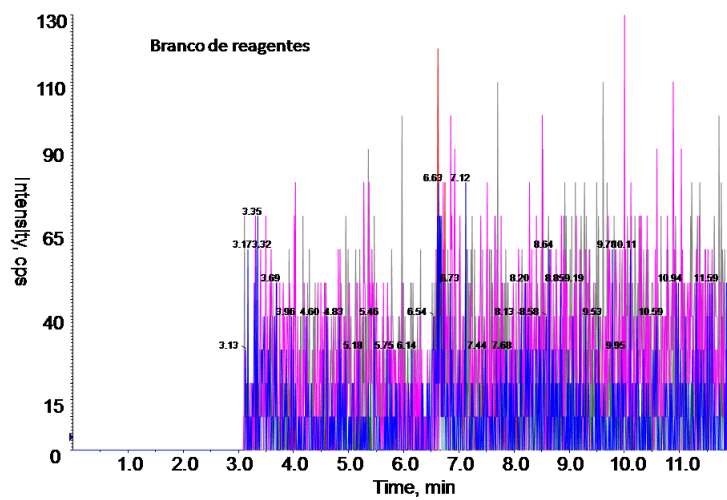


Figura 21: Cromatograma do branco de reagentes (pepsina e glicina), sem adição do padrão de caseinomacropaptídeo (CMP).



#### 5.2.5.4. Repetitividade e Reprodutibilidade

A tabela XXI apresenta o resumo dos resultados deste experimento, os dados brutos estão descritos no Anexo V. Nesta concentração os critérios de aceitação (EC/657/2002) permitem coeficientes de variação (CV) de até 16% para CV inter dia e de 10 % para CV intra dia. O método apresentou valores de CV intra dia para o nível 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  acima do estabelecido na EC/657/2002.

Tabela XXI. Resultados do ensaio de repetitividade e reprodutibilidade para avaliação de desempenho do método utilizando pepsina na digestão de caseinomacropeptídeo (CMP) em leite bovino.

Curva analítica	Coeficiente angular	Intercepto	Coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,97$ )	
<b>Dia 1</b>	3,17E+04	363818,65	$R^2 = 0,9891$	
<b>Dia 2</b>	2,99E+04	240786,37	$R^2 = 0,9911$	
<b>Dia 3</b>	2,65E+04	241455,32	$R^2 = 0,9959$	
Nível ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Média Global ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV Intra Dia % (CV<10)	CV Inter Dia % (CV<16)	CV precisão intermediária
<b>15,00</b>	13,7	7,4	3,8	8,3
<b>30,00*</b>	26,2	11,5	2,2	11,7
<b>45,00</b>	40,5	8,0	5,3	9,6

CV: Coeficiente de variação; \*30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Limite máximo estabelecido na Instrução Normativa nº68 de 2006).

#### 5.2.5.5. Testes de incubação de *Pseudomonas fluorescens* em leite

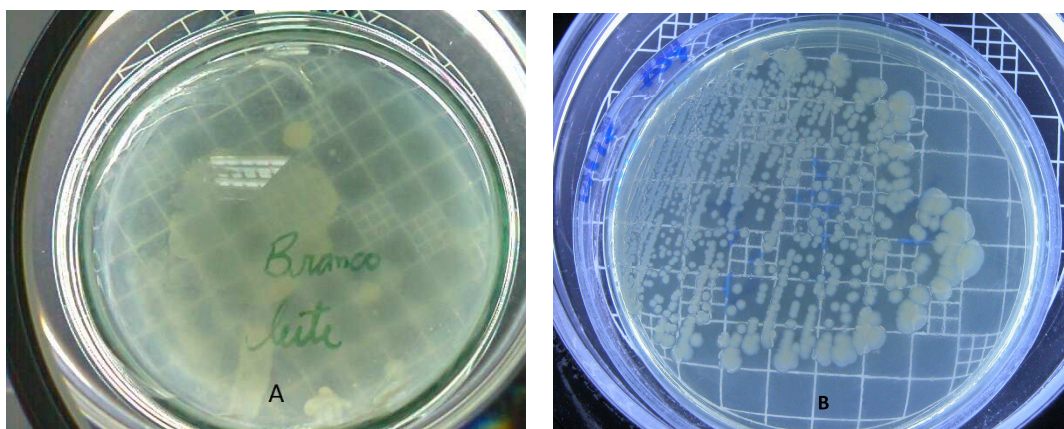


Figura 22. (A) Placa contendo leite; (B) Placa contendo leite incubado com *Pseudomonas fluorescens*. Tempo de incubação: 72 horas. Temperatura de incubação 25 °C.

A Figura 22 A e B apresenta as placas contendo leite com e sem *P. fluorescens*, respectivamente, evidenciando o crescimento na placa B somente após 72 horas. Os testes de incubação de *P. fluorescens* em leite para produção de pseudo-CMP, mostraram que houve crescimento bacteriano e precipitação das proteínas após 72 horas a 25 °C, entretanto a análise dos produtos da digestão do pseudo-CMP não foi conclusiva. Neste caso, um trabalho mais detalhado se faz necessário para atingir os resultados desejados. Como este não é o objetivo do presente trabalho, fica a indicação para um trabalho futuro.

#### 5.2.5.6. Análise de amostras reais

Neste experimento foram analisadas amostras de leite cru de diversos estados brasileiros. A Figura 23 apresenta o gráfico da análise de amostras de leite cru de diversos estados do Brasil, neste estudo pretendeu-se estimar a quantidade de CMP endógeno presente no leite cru recém ordenhado. Sabe-se que em processos metabólicos normais, pode-se antever proteólise endógena, a qual pode estar relacionada com uma grande série de fatores, como alimentação, clima, sazonalidade, idade, etc. Este estudo tentou levar em conta as

diferenças mais relevantes referente ao rebanho bovino leiteiro nacional, como regionalidade e perfil genético. Os resultados preliminares demonstram que a maioria das amostras analisadas contém CMP em concentrações próximas ao limite de quantificação, exceto GO 01 e PA F. A média das concentrações, sem as amostras GO 1 e PF, foi de  $5,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se considerarmos esse valor como a média de CMP endógeno encontrado em condições sanitárias normais no gado brasileiro, sugere-se a futura ampliação deste estudo de modo a estabelecer novos parâmetros de qualidade para o leite nacional, uma vez que a média de CMP endógeno está significativamente mais baixo do que os limites de tolerância atualmente vigentes.

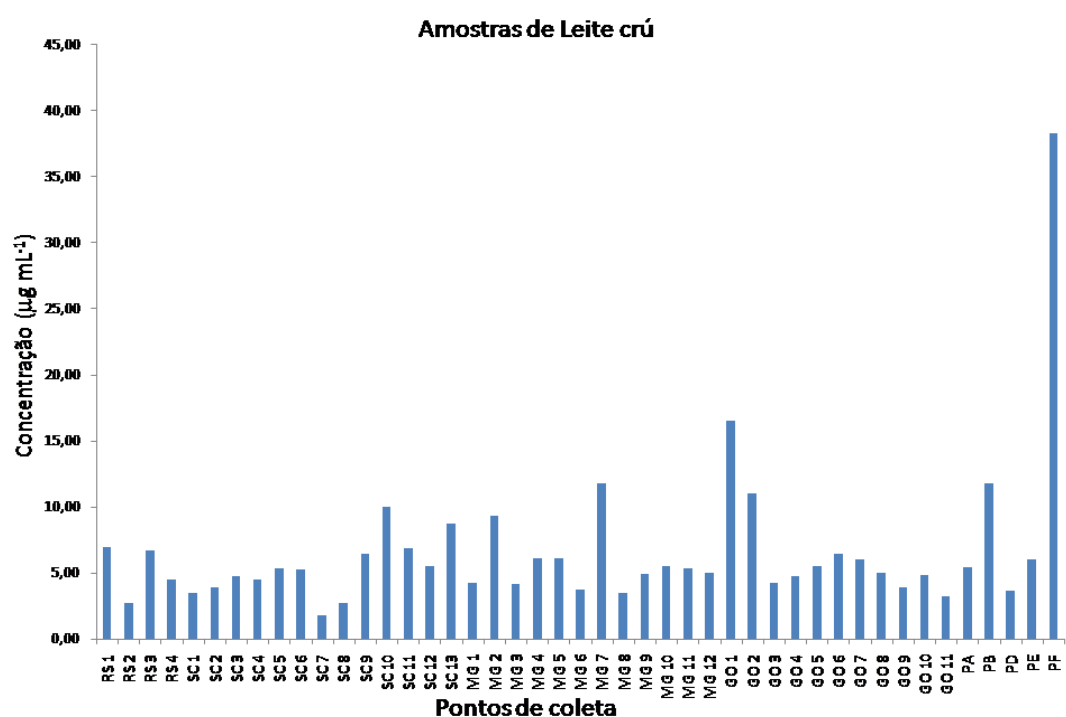


Figura 23. Gráfico da determinação de caseinmacropeptídeo em amostras de leite cru de diversos estados do Brasil. RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; GO: Goiás; MG: Minas Gerais; P: Pará. A numeração refere-se aos laticínios coletados em cada estado.

## 6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento da metodologia para a análise confirmatória por CLAE-EM/EM para diferenciação do CMP e pseudo-CMP utilizando digestão trípica se mostrou eficiente. Entretanto, este método é somente confirmatório, pois não foi possível efetuar a validação devido a grande variação observada na etapa de EFS nos ensaios de repetitividade inter dia. A necessidade de análise por cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos (método oficial) não pode ser desconsiderada.

O método de precipitação e extração dos analitos utilizando banho de ultrassom foi desenvolvido e validado por comparação ao método oficial do MAPA, apresentando-se como alternativa àquele utilizado pelo Ministério da Agricultura (IN 68, 2006). O protocolo de Extração em Fase Sólida para purificação e concentração dos analitos passou a substituir o sistema de coleta de frações (IN 07, 2010) reduzindo o tempo de análise de 7 horas para 30 minutos por amostra.

A separação por cromatografia líquida utilizando a coluna PLRP-S foi eficiente e a utilização de peptídeos sintéticos permitiu a otimização dos parâmetros de espectrometria de massas, tendo em vista que não existe padrão analítico de pseudo-CMP.

A escolha de uma enzima (pepsina) que tenha seu ponto ótimo de digestão em pH baixo, foi de extrema importância, pois além de mais rápido, o método não apresenta erros referentes as várias etapas de purificação da metodologia com digestão trípica para mudança de solvente.

A validação da metodologia de digestão com pepsina apresentou resultados que atendem aos critérios da Diretiva Européia (EC/657/2002). Esta diretiva está relacionada a análise de resíduos em alimentos, apresentando rígidos critérios de aceitabilidade nos ensaios realizados neste experimento.

O desenvolvimento deste método pode ser considerado quantitativo para determinação de caseinomacropéptido (CMP), marcador da adulteração de leite bovino por adição de soro de queijo. Entretanto, para quantificar pseudo-caseinomacropéptido (pseudo-CMP),

marcador de contaminação bacteriana, há a necessidade de validação com padrão de pseudo-CMP, o qual não existe para comercialização. Uma alternativa seria produzi-lo, em grande escala, através da incubação de *P. fluorescens* em leite. Porém, o experimento não apresentou resultados conclusivos, mas forneceu indicativos para trabalho futuro.

A aplicação do método de digestão com pepsina para amostras reais de leite cru demonstrou a existência de uma quantidade variável de CMP endógeno no leite, o qual não seria proveniente nem da adulteração por adição de soro de queijo e nem por ação de proteases expressas por bactérias psicrotóficas. Sugere-se a hipótese de se tratar de um índice basal, originado pela autoproólise relacionada aos processos proteolíticos endógenos, sendo ambos processos fisiológicos normais, mas que precisam ser estabelecidos com exatidão para futura revisão dos parâmetros adotados para o controle da qualidade do leite.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Phadungath, C. Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **27**, 201–212 (2005).
2. O Estadão e São Paulo, F. J. R. K. Jornal O Estadão. (2007). at <<http://www.estadao.com.br/noticias/impresso-milagre-da-multiplicacao-do-leite,76634,0.htm>>
3. BRASIL, M. da A., Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa N° 69*. (2006). at <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>
4. Fajardo-Lira, C. E. & Nielsen, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. *Journal of dairy science* **81**, 901–908 (1998).
5. DOS SANTOS, P. A. *et al.* EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE DO LEITE INOCULADO IN VITRO COM *Pseudomonas fluorescens*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* **28**, (2010).
6. Miralles, B., Ramos, M. & Amigo, L. Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis. *Journal of dairy science* **86**, 2813–2817 (2003).
7. Medina, F. C., Vivian, F., Nádia, C. & Ribeiro, A. M. Presença de *Pseudomonas spp* em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. (2006).
8. Swaisgood, H. E. Chemistry of the caseins. *Advanced dairy chemistry* **1**, 139–201 (2003).
9. Fiat, A. M. & Jollès, P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Molecular and cellular biochemistry* **87**, 5–30 (1989).
10. Miranda, G., Anglade, P., Mahé, M. F. & Erhardt, G. Biochemical characterization of the bovine genetic K-casein C and E variants. *Animal genetics* **24**, 27–31 (1993).
11. ALEXANDER, L. J. *et al.* Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *European Journal of Biochemistry* **178**, 395–401 (1988).
12. Formaggioni, P., Summer, A., Malacarne, M. & Mariani, P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in bos genus. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria* **12**, 127–165 (1999).
13. Talbo, G. H., Suckau, D., Malkoski, M. & Reynolds, E. C. MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropptide. *Peptides* **22**, 1093–1098 (2001).
14. Minkiewicz, P. *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine  $\kappa$ -casein macropptide and characterization of isolated fractions. *Journal of Chromatography A* **743**, 123–135 (1996).
15. Kreufl, M., Krause, I. & Kulozik, U. Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropptide using different anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1208**, 126–132 (2008).
16. Thomä, C., Krause, I. & Kulozik, U. Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *International dairy journal* **16**, 285–293 (2006).
17. Van Riel, J. & Olieman, C. Determination of caseinomacropptide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis* **16**, 529–533 (1995).

18. De Jong, N., Visser, S. & Olieman, C. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **652**, 207–213 (1993).
19. RECIO, I., AMIGO, L., RAMOS, M. & LOPEZ-FANDIÑO, R. Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *Journal of dairy research* **64**, 221–230 (1997).
20. Molle, D. & Leonil, J. Quantitative determination of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). *International dairy journal* **15**, 419–428 (2005).
21. Zhang, J. *et al.* Quantitative determination of bovine caseinoglycomacropeptide in infant formulas by ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry. *Journal of separation science* (2011).
22. MAGALHÃES, M. A. DETERMINAÇÃO DE FRAUDE DE LEITE COM SORO DE LEITE PELA ANÁLISE DE CMP E PSEUDO-CMP POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA. (2008).
23. BRASIL, M. da A., Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa N° 51*. (2002). at <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>
24. Luís Fernando Laranmja da Fonseca, M. V. dos S. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. (Manole Ltda, 2007).
25. Léonil, J. & Mollé, D. Liberation of tryptic fragments from caseinomacropeptide of bovine kappa-casein involved in platelet function. Kinetic study. *Biochemical Journal* **271**, 247 (1990).
26. Recio, I., López-Fandiño, R., Olano, A., Olieman, C. & Ramos, M. Study of the formation of caseinomacropeptides in stored ultra-high-temperature-treated milk by capillary electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry* **44**, 3845–3848 (1996).
27. Mayerhofer, H. J., Marshall, R. T., White, C. H. & Lu, M. Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *Applied Microbiology* **25**, 44–48 (1973).
28. Kohlmann, K. L., Nielsen, S. S., Steenson, L. R. & Ladisch, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *Journal of dairy science* **74**, 3275–3283 (1991).
29. Koka, R. & Weimer, B. C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *Journal of applied microbiology* **89**, 280–288 (2000).
30. Dogan, B. & Boor, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and environmental microbiology* **69**, 130–138 (2003).
31. Schroder, M. J. ., Cousins, C. M. & McKinnon, C. H. Effect of psychrotrophic post-pasteurization contamination on the keeping quality at 11 and 5 C of HTST-pasteurized milk in the UK. *Journal of Dairy Research* **49**, 619–630 (1982).
32. BRASIL, M. da A., Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa N° 68*. (2006). at <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>

33. BRASIL, M. da A., Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa N° 7*. (2010). at <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>
34. Qian, Z. Y., Jollčs, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F. & Fiat, A. M. Sheep [kappa]-casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1244**, 411–417 (1995).
35. Norrgran, J. *et al.* Optimization of digestion parameters for protein quantification. *Analytical biochemistry* **393**, 48–55 (2009).
36. López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J. Á., Amigo, L. & Recio, I. Identification of antibacterial peptides from ovine  $\alpha$ -s<sub>2</sub>-casein. *International dairy journal* **16**, 1072–1080 (2006).
37. Cantú, M. D., Carrilho, E., Wulff, N. A. & Palma, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim. Nova* **31**, 669–675 (2008).
38. Martin-Orue, C., Henry, G. & Bouhallab, S. Tryptic hydrolysis of [kappa]-caseinomacropeptide: control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. *Enzyme and microbial technology* **24**, 173–180 (1999).
39. López Expósito, I. & Recio, I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International dairy journal* **16**, 1294–1305 (2006).
40. ENTRIES, N. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Eur. J. Biochem* **233**, 139 (1995).
41. ALBANO, F. & RAYA-RODRIGUEZ, M. Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático. *Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático* (2009).
42. Elgar, D. F. *et al.* Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene–divinylbenzene. *Journal of chromatography A* **878**, 183–196 (2000).
43. Charnet, R., Freire, C. de L., Charnet, E. M. R. & Bonvino, H. *Análises de modelos de regressão linear com aplicações*. (UNICAMP, 1999).



## ANEXO I (Fórmulas obtidas da referência 43)

Fórmulas para o teste para igualdade dos interceptos: H0

$$H0: \beta a_{MO} = \beta a_{MUS}$$

$$H1: \beta a_{MO} \neq \beta a_{MUS}$$

$$T_{\beta a} = \frac{\beta a_{MO} - \beta a_{MUS}}{\sqrt{S_{\beta a}}}$$

$$S_{\beta a} = \frac{SQE(MO) + SQE(MUS)}{n_{MO} + n_{MUS} - 4} \left[ \frac{1}{n_{MO}} + \frac{1}{n_{MUS}} + \frac{\bar{x}_{MO}^2}{S_{xxMO}} + \frac{\bar{x}_{MUS}^2}{S_{xxMUS}} \right]$$

Fórmulas para o teste para igualdade das inclinações: H0

$$H0: \beta b_{MO} = \beta b_{MUS}$$

$$H1: \beta b_{MO} \neq \beta b_{MUS}$$

$$T_{\beta b} = \frac{\beta b_{MO} - \beta b_{MUS}}{\sqrt{S_{\beta b}}}$$

$$S_{\beta b} = \frac{SQE(MO) + SQE(MUS)}{n_{MO} + n_{MUS} - 4} \left[ \frac{1}{S_{xxMO}} + \frac{1}{S_{xxMUS}} \right]$$

Rejeita H0 se:

$$|T_{\beta a}| \geq t \left( \frac{\alpha}{2}, (n_{MO} + n_{MUS} - 4) \right)$$

a: intercepto

b: inclinação

SQE: soma dos quadrados do resíduo

MO: método de extração oficial

MUS: método de extração com banho de ultrassom

n: número de amostras

Sxx: variância de x

x: média

**Cálculos do teste-t para verificação de igualdade entre curvas analíticas dos métodos de extração oficial (MO) e com banho de ultrassom (MUS).**

RESUMO DOS RESULTADOS		Curva	0	0
Método oficial		MO	0	0
			25	895104
			25	883134
			50	1458116
<i>Estatística de regressão</i>			50	1447467
R múltiplo	0,997889386		75	2045389
R-Quadrado	0,995783226		75	2044768
R-quadrado ajustado	0,995361548		100	2644146
Erro padrão	110424,727		100	2640284
Observações	12		200	4918546
			200	4916147
ANOVA				
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	2,8795E+13	2,8795E+13	2361,481054
Resíduo	10	1,21936E+11	12193620341	
Total	11	2,89169E+13		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	191247,9	48866,32088	3,913695497	0,002895849
Variável X 1	23997,918	493,8343921	48,59507232	3,28675E-13

RESUMO DOS RESULTADOS		Curva	0	0
Método com ultrassom		MUS	0	0
			25	854167
			25	848974
			50	1403370
<i>Estatística de regressão</i>			50	1400436
R múltiplo	0,996761579		75	1989788
R-Quadrado	0,993533645		75	1984606
R-quadrado ajustado	0,992887009		100	2288314
Erro padrão	133722,3811		100	2292651
Observações	12		200	4849953
			200	4852368
ANOVA				
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Regressão	1	2,74746E+13	2,74746E+13	1536,466168
Resíduo	10	1,78817E+11	17881675201	
Total	11	2,76534E+13		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	138959,175	59176,24574	2,348225597	0,040763806
Variável X 1	23441,241	598,0246684	39,1977827	2,78979E-12

**Teste para igualdade de interceptos**

<b>SQE(MO)</b>	<b>1,21936E+11</b>	<b>n1</b>	<b>12</b>
<b>SQE(MUS)</b>	<b>1,78817E+11</b>	<b>n2</b>	<b>12</b>
<b>Média</b>	<b>75</b>	<b>(Média)<sup>2</sup></b>	<b>5625</b>
<b>Média</b>	<b>75</b>	<b>(Média)<sup>2</sup></b>	<b>5625</b>
<b>S<sup>1</sup>xx</b>	<b>50000</b>		
<b>S<sup>21</sup>xx</b>	<b>50000</b>		
		<b>Graus de liberdade</b>	<b>20</b>
<b>a(MO)</b>	<b>191247,9</b>		
<b>a(MUS)</b>	<b>138959,2</b>		

**S(a)**      15037647771      0,391666667      **5889745377**

**T(a)**      **0,681**      **módulo**

t(α/2,20)      2,086      Bicaudal      não difere  
t(α,20)      2,423      unicaudal      não difere

**CONCLUSÃO: COM 95% DE CONFIANÇA OS INTERCEPTOS SÃO EQUIVALENTES (NÃO tem diferença significativa).**

**Teste para igualdade de inclinações**

**Teste do paralelismo das retas**

<b>SQE(MO)</b>	<b>1,21936E+11</b>	<b>n1</b>	<b>12</b>
<b>SQE(MUS)</b>	<b>1,78817E+11</b>	<b>n2</b>	<b>12</b>
<b>Média</b>	<b>75</b>	<b>(Média)<sup>2</sup></b>	<b>5625</b>
<b>Média</b>	<b>75</b>	<b>(Média)<sup>2</sup></b>	<b>5625</b>
<b>S<sup>1</sup>xx</b>	<b>50000</b>		
<b>S<sup>21</sup>xx</b>	<b>50000</b>		
		<b>Graus de liberdade</b>	<b>20</b>
<b>b (MO)</b>	<b>23997,9</b>		
<b>b (MUS)</b>	<b>23441,2</b>		

**S(b)**      15037647771      0,00004      **601505,9108**

**T(b)**      **0,718**      **módulo**

t(α/2,20)      2,101      não difere  
t(α,20)      2,445      não difere

**CONCLUSÃO: A DECLIVIDADE DAS RETAS NÃO DIFERE DE FORMA SIGNIFICATIVA COM 95% DE CONFIANÇA.**

## ANEXO II

### Descrição da otimização dos parâmetros do analisador de massas (CLAE-EM/EM)

A otimização e desenvolvimento de uma metodologia por CLAE-EM/EM são necessários três etapas:

Primeira etapa: infusão dos padrões separadamente para determinar os íons moleculares e a otimização da fragmentação dos analitos;

Os parâmetros otimizados nesta etapa são:

CAD (*CAD Gas*, que controla a pressão do gás na célula de colisão);

DP (*Declustering Potential*, controla a voltagem no orifício de entrada do QqQ).

EP (*Entrance Potential*, controla o potencial de entrada dos analitos no Q0)

CXP (*Collision Cell Exit Potential*, controla o potencial da saída da célula de colisão Q2), CE (*Collision Energy*, controla o potencial aplicado na célula de colisão Q2, entre outros).

Segunda etapa: ocorre a otimização das condições da fonte de ionização (FIA) do inglês *flow injection analysis*. Nesta etapa os e preparada uma solução contendo todos os analitos em estudo e os seguintes parâmetros, descritos abaixo, são ajustados de maneira a obter a melhor condição para um analito ou um grupo de analitos.

GS1 (*Gas1*, controla o gás de nebulização);

GS2 (*Gas2*, controla o gás auxiliar);

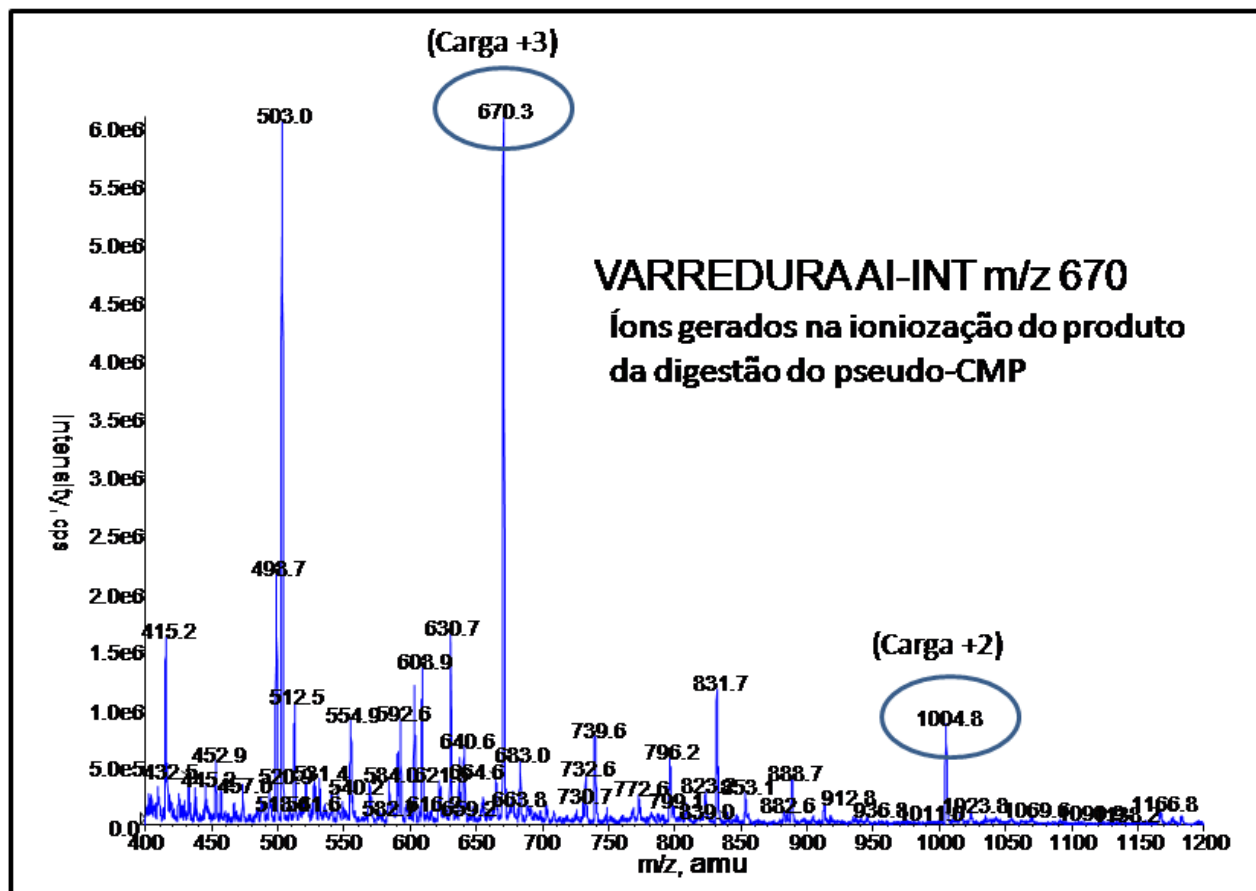
TEM (*Temperature*, temperatura do *heater*);

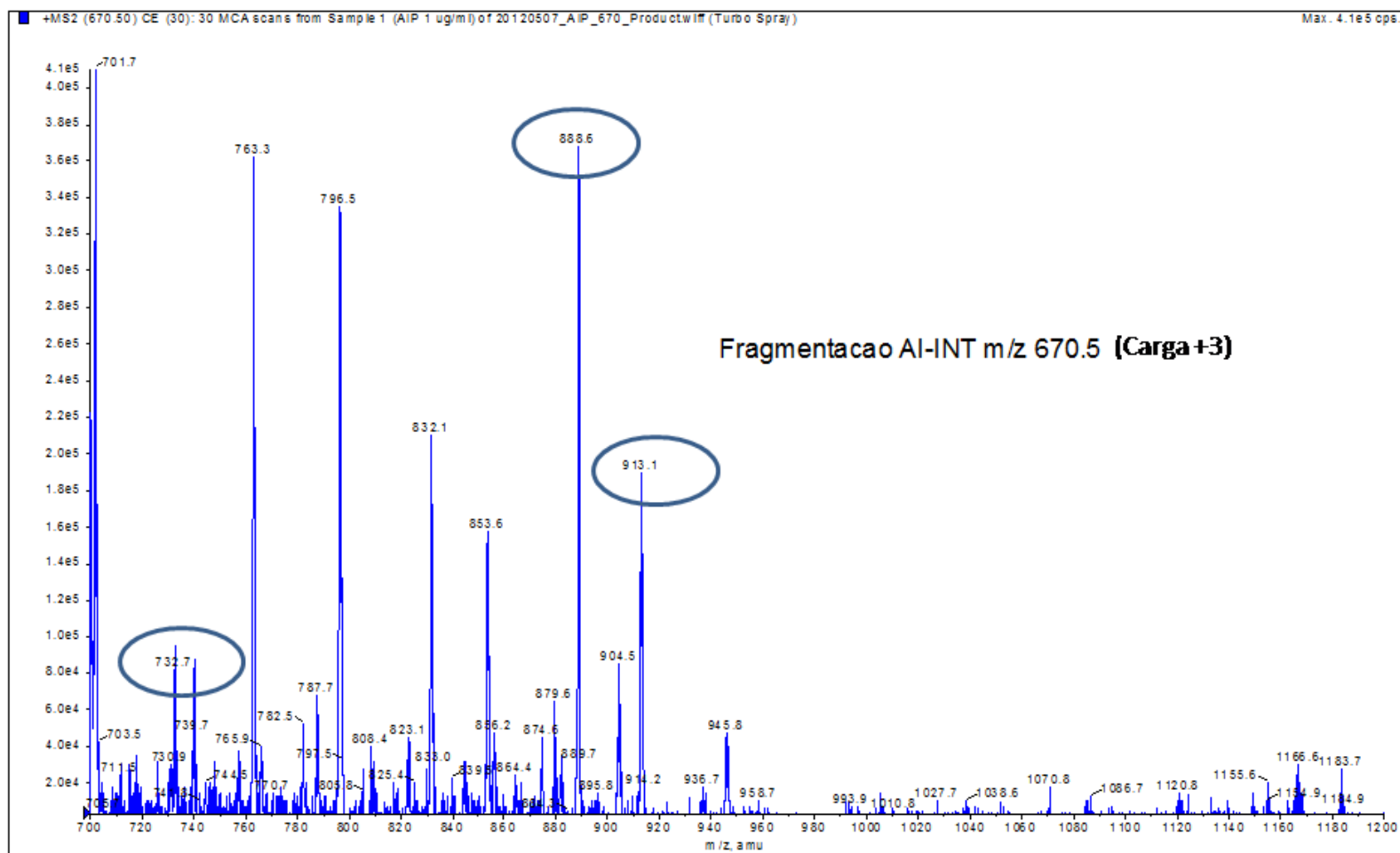
CUR (*CurtainGas*, o gás com fluxo entre o *curtainplate* e o orifício de entrada para o QqQ);

IS (*Ion Spray Voltage* controla a voltagem aplicada à agulha que ioniza a amostra na fonte).

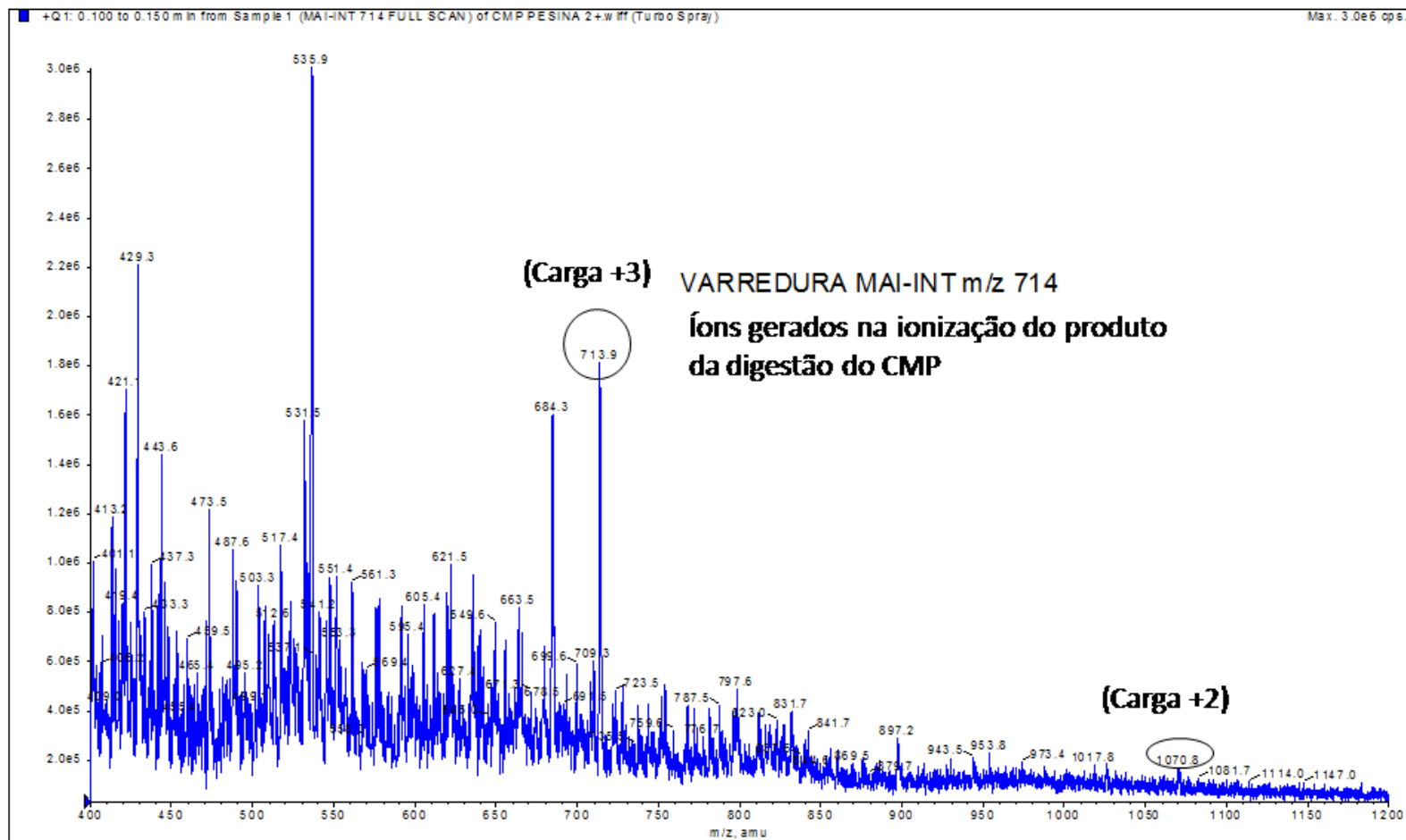
### ANEXO III

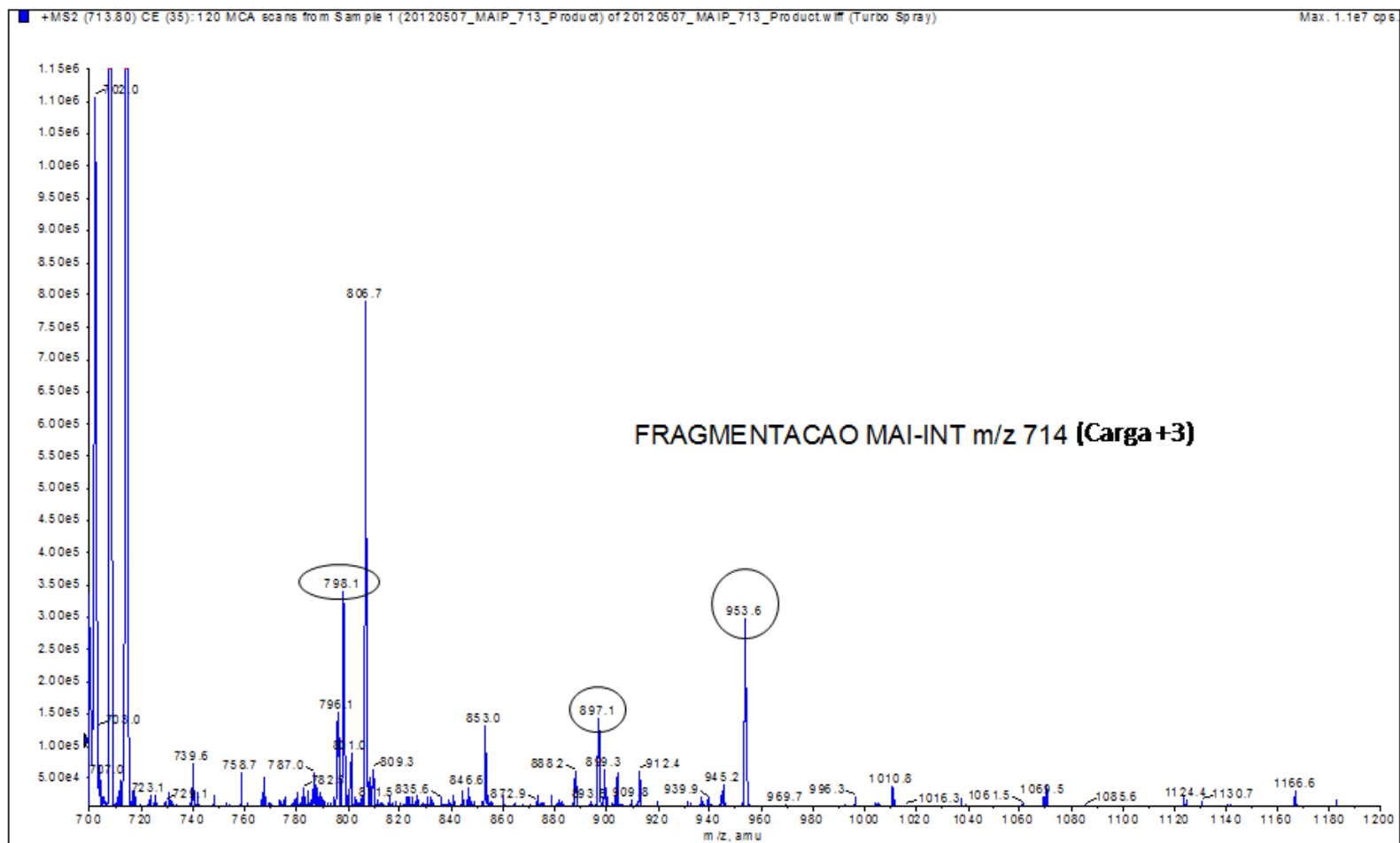
Espectros de varredura e fragmentação do íon molecular AIN-T (produto da digestão do pseudo-CMP com pepsina)





### Espectros de varredura e fragmentação do íon molecular MAIN-T (produto da digestão do CMP)







## ANEXO IV

### Dados brutos da avaliação de desempenho do método de extração utilizando banho de ultrassom.

Lote/Nível	15 µg.mL <sup>-1</sup>	Área	Conc. Calc.	30 µg.mL <sup>-1</sup>	Área	Conc. Calc.	45 µg.mL <sup>-1</sup>	Área	Conc. Calc.
LOTE 1 Analista 1	15_1	465052	18,75	30_1	725807	32,88	45_1	982189	46,77
	15_2	480412	19,58	30_2	778059	35,71	45_2	1037914	49,79
	15_3	456778	18,30	30_3	771529	35,36	45_3	1026843	49,19
	15_4	477962	19,45	30_4	762554	34,87	45_4	1019048	48,77
	15_5	451608	18,02	30_5	872456	40,83	45_5	1042084	50,02
	15_6	459313	18,44	30_6	800887	36,95	45_6	998212	47,64
	15_7	484737	19,82	30_7	740237	33,66	45_7	971960	46,22
LOTE 2 Analista 1	15_1	515367	19,31	30_1	747488	30,97	45_1	1109399	49,15
	15_2	555565	21,33	30_2	814505	34,34	45_2	1004078	43,86
	15_3	536484	20,37	30_3	706156	28,89	45_3	1090891	48,22
	15_4	515251	19,30	30_4	787146	32,96	45_4	1043628	45,84
	15_5	543610	20,73	30_5	808957	34,06	45_5	1168953	52,14
	15_6	524753	19,78	30_6	804067	33,81	45_6	1056837	46,51
	15_7	522424	19,67	30_7	824824	34,85	45_7	1056055	46,47
LOTE 4 Analista 2	15_1	541581	20,63	30_1	858008	36,52	45_1	1172130	52,30
	15_2	596080	23,36	30_2	837007	35,47	45_2	1124171	49,89
	15_3	546226	20,86	30_3	828888	35,06	45_3	1135206	50,44
	15_4	496043	18,34	30_4	892914	38,27	45_4	1051597	46,24
	15_5	546498	20,87	30_5	850115	36,12	45_5	1133141	50,34
	15_6	542204	20,66	30_6	843633	35,80	45_6	1083434	47,84
	15_7	522945	19,69	30_7	846368	35,94	45_7	1108176	49,09
		<b>Média</b>	19,87		<b>Média</b>	34,92		<b>Média</b>	48,42
		<b>Desvio</b>	1,25		<b>Desvio</b>	2,46		<b>Desvio</b>	2,16
		<b>CV%</b>	6,27		<b>CV%</b>	7,05		<b>CV%</b>	4,46
		<b>Variância</b>	0,50		<b>Variância</b>	6,05		<b>Variância</b>	4,66

# ANEXO V

## Dados brutos do experimento de Repetitividade e Reprodutibilidade do método com pepsina.

RPM - Leite bovino		Dia 1		Pico Quantificação		Pico Confirmação			
Raw data file	Categoria do vial	Padrão	713.800 / 953.700	713.800 / 798.000	Razão Ions Confirmação - RI (Padrões)	Razão Ions Confirmação - RI (Amostras)	Confirmação	Concentração Calculada	
	Padrão	0,00	300000	155000	0,5167				
	Padrão	0,00	280000	157000	0,5607				
	Padrão	5,00	736000	356000	0,4837		OK	11,74	
	Padrão	5,00	662000	333000	0,5030		OK	9,41	
	Padrão	10,00	620000	311000	0,5016		OK	8,08	
	Padrão	10,00	558000	299000	0,5358		OK	6,13	
	Padrão	30,00	1360000	665000	0,4890		OK	31,43	
	Padrão	30,00	1220000	619000	0,5074		OK	27,02	
	Padrão	60,00	2360000	1160000	0,4915		OK	62,99	
	Padrão	60,00	2200000	1110000	0,5045		OK	57,94	
	Padrão	90,00	3320000	1610000	0,4849		OK	93,28	
	Padrão	90,00	3110000	1580000	0,5080		OK	86,65	
		15,00	770000	381000		0,4948	OK	12,82	
		15,00	864000	413000		0,4780	OK	15,78	
		15,00	774000	341000		0,4406	OK	12,94	
		15,00	855000	378000		0,4421	OK	15,50	
		15,00	767000	399000		0,5202	OK	12,72	
		15,00	749000	401000		0,5354	OK	12,15	
		15,00	859000	306000		0,3562	OK	15,62	
		30,00	1250000	658000		0,5264	OK	27,96	
		30,00	1310000	672000		0,5130	OK	29,85	
		30,00	1190000	609000		0,5118	OK	26,07	
		30,00	1060000	559000		0,5274	OK	21,97	
		30,00	1090000	557000		0,5110	OK	22,91	
		30,00	1060000	557000		0,5255	OK	21,97	
		30,00	1160000	604000		0,5207	OK	25,12	
		45,00	1520000	780000		0,5132	OK	36,48	
		45,00	1560000	805000		0,5160	OK	37,74	
		45,00	1480000	758000		0,5122	OK	35,22	
		45,00	1740000	889000		0,5109	OK	43,42	
		45,00	1610000	821000		0,5099	OK	39,32	
		45,00	1640000	847000		0,5165	OK	40,27	
		45,00	1670000	851000		0,5096	OK	41,21	

**Curva Lote 1**

Área (µg)

Concentração (µg mL-1)

$y = 31693x + 363819$   
 $R^2 = 0,9891$

Nível de Fortificação (µg/kg)			
	15,00	30,00	45,00
Mean	805428,6	1160000,0	1602857,1
S.D.	51091,0	96953,6	89947,1
C.V.	6,3	8,4	5,6
% Recovery	5369524	3866667	3561905
n	7	7	7

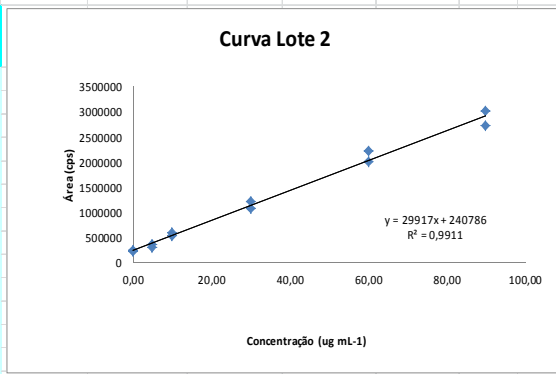
Curva de Calibração	
Intercepção	363818,6562
Inclinação	3,17E+04
r	0,9945
r2	0,9891

Faixa de aceitação RI	
	Padrão
Média	0,501
Tolerância	20
Inferior	0,401
Superior	0,601

**RPM - Leite bovino** **Dia 2**

Raw data file	Categoria do vial	Padrão	Pico		Razão Ions Confirmação (Padrões)	Razão Ions Confirmação (Amostras)	Confirmação	Concentração Calculada (µg/kg)
			Quantificação	Confirmação				
			713.800 / 953.700	713.800 / 798.000				
	Padrão	0,00	247000	134000	0,5425			
	Padrão	0,00	225000	125000	0,5556			
	Padrão	5,00	362000	201000	0,5552		OK	4,05
	Padrão	5,00	310000	173000	0,5581		OK	2,31
	Padrão	10,00	597000	305000	0,5109		OK	11,91
	Padrão	10,00	536000	286000	0,5336		OK	9,87
	Padrão	30,00	1210000	595000	0,4917		OK	32,40
	Padrão	30,00	1080000	559000	0,5176		OK	28,05
	Padrão	60,00	2220000	1080000	0,4865		OK	66,16
	Padrão	60,00	2020000	1020000	0,5050		OK	59,47
	Padrão	90,00	3020000	1470000	0,4868		OK	92,90
	Padrão	90,00	2730000	1370000	0,5018		OK	83,20
		15,00	641000	346000		0,5398	OK	13,38
		15,00	642000	338000		0,5265	OK	13,41
		15,00	587000	324000		0,5520	OK	11,57
		15,00	707000	386000		0,5460	OK	15,58
		15,00	684000	414000		0,6053	OK	14,81
		15,00	660000	350000		0,5303	OK	14,01
		15,00	544000	304000		0,5588	OK	10,14
		30,00	919000	483000		0,5256	OK	22,67
		30,00	1010000	519000		0,5139	OK	25,71
		30,00	1160000	602000		0,5190	OK	30,73
		30,00	970000	516000		0,5320	OK	24,37
		30,00	1020000	521000		0,5108	OK	26,05
		30,00	1020000	526000		0,5157	OK	26,05
		30,00	1240000	637000		0,5137	OK	33,40
		45,00	1150000	603000		0,5243	OK	30,39
		45,00	1930000	993000		0,5145	OK	56,46
		45,00	1520000	781000		0,5138	OK	42,76
		45,00	1640000	842000		0,5134	OK	46,77
		45,00	1180000	623000		0,5280	OK	31,39
		45,00	1390000	724000		0,5209	OK	38,41
		45,00	1560000	805000		0,5160	OK	44,10



Nível de Fortificação (µg / kg)			
	15,00	30,00	45,00
Mean	637857,1	1048428,6	1481428,6
S.D.	56010,2	111910,5	271749,2
C.V.	8,8	10,7	18,3
% Recovery	4252381	3494762	3292063
n	7	7	7

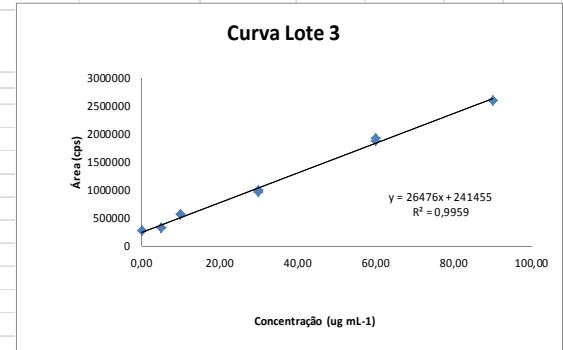
Curva de Calibração	
Intercepção	240786,3666
Inclinação	2,99E+04
r	0,9956
r2	0,9911

Faixa de aceitação RI	Padrão
Média	0,515
Tolerância	20
Inferior	0,412
Superior	0,618

**RPM - Leite bovino**

**Dia 3**

Raw data file	Categoria do vial	Padrão	Pico		Razão Ions Confirmação (Padrões)	Razão Ions Confirmação (Amostras)	Confirmação	Concentração Calculada (µg/kg)
			Quantificação	Confirmação				
			713.800 / 953.700	713.800 / 798.000				
	Padrão	0,00	263000	171000	0,6502			
	Padrão	0,00	272000	180000	0,6618			
	Padrão	5,00	314000	203000	0,6465		OK	2,74
	Padrão	5,00	311000	205000	0,6592		OK	2,63
	Padrão	10,00	563000	332000	0,5897		OK	12,14
	Padrão	10,00	559000	328000	0,5868		OK	11,99
	Padrão	30,00	954000	537000	0,5629		OK	26,91
	Padrão	30,00	997000	554000	0,5557		OK	28,54
	Padrão	60,00	1870000	986000	0,5273		OK	61,51
	Padrão	60,00	1930000	1010000	0,5233		OK	63,78
	Padrão	90,00	2600000	1350000	0,5192		OK	89,08
	Padrão	90,00	2590000	1350000	0,5212		OK	88,71
		15,00	654000	374000		0,5719	OK	15,58
		15,00	676000	390000		0,5769	OK	16,41
		15,00	564000	344000		0,6099	OK	12,18
		15,00	639000	442000		0,6917	OK	15,02
		15,00	632000	314000		0,4968	OK	14,75
		15,00	671000	395000		0,5887	OK	16,22
		15,00	625000	414000		0,6624	OK	14,49
		30,00	933000	530000		0,5681	OK	26,12
		30,00	987000	549000		0,5562	OK	28,16
		30,00	853000	484000		0,5674	OK	23,10
		30,00	902000	504000		0,5588	OK	24,95
		30,00	968000	545000		0,5630	OK	27,44
		30,00	962000	545000		0,5665	OK	27,22
		30,00	1010000	566000		0,5604	OK	29,03
		45,00	1320000	727000		0,5508	OK	40,74
		45,00	1190000	654000		0,5496	OK	35,83
		45,00	1270000	689000		0,5425	OK	38,85
		45,00	1530000	829000		0,5418	OK	48,67
		45,00	1060000	603000		0,5689	OK	30,92
		45,00	1410000	758000		0,5376	OK	44,14
		45,00	1470000	773000		0,5259	OK	46,40



Nível de Fortificação (µg/kg)			
	15,00	30,00	45,00
Mean	637285,7	945000,0	1321428,6
S.D.	37566,4	53640,8	164157,3
C.V.	5,9	5,7	12,4
% Recovery	4248571	3150000	2936508
n	7	7	7

Curva de Calibração	
Intercepção	241455,3164
Inclinação	2,65E+04
r	0,9980
r2	0,9959

Faixa de aceitação RI	Padrão
Média	0,569
Tolerância	20
Inferior	0,455
Superior	0,683